

**Untersuchung zur Selektivität
der Hemmung von Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen
durch die dazugehörigen Propeptide**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Yvonne Benedix,
geboren am 05. Februar 1979 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter 1

Gutachter 2

Gutachter 3

Tag der öffentlichen Verteidigung

Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	7
1. Einleitung	9
2. Materialien und Methodik	16
2.1. Materialien	16
2.1.1. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme, Standards und Substrate	16
2.1.2. Kits zur Bearbeitung von DNA	17
2.1.3. Verwendete Vektoren und Bakterienstämme	17
2.1.4. Geräte	18
2.1.5. Spezielle Computerprogramme	19
2.2. Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1. Amplifizierung der Proregionen von Cathepsin H und L mittels PCR	19
2.2.2. DNA-Trennung im Agarosegel und Extraktion	21
2.2.3. Klonierung, Ligation, Transformation und DNA-Isolierung	21
2.2.4. DNA-Sequenzanalyse	25
2.3. Proteinchemische Methoden	26
2.3.1. Expression und Reinigung der rekombinanten Propeptide	26
2.3.2. Reinigung der Einschlusskörperchen durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	27
2.3.3. Endreinigung des Propeptids durch Gelfiltration	28
2.3.4. Charakterisierung der rekombinanten Propeptide	29
2.3.5. Massenspektrometrie durch MALDI-TOF	31
2.4. Kinetische Messung	31
2.4.1. Testdurchführung	31
2.4.2. Bestimmung des K_M -Wertes	33
2.4.3. Bestimmung der Inhibitionskonstanten K_i und k_{off}	34
3. Ergebnisse	37
3.1. Herstellung der Propeptide von Cathepsin H (kurz), Cathepsin H (lang) und Cathepsin L	37
3.1.1. Herstellung des Expressionsvektor	38
3.1.2. Bakterielle Expression der Propeptide	40
3.1.3. Reinigung und Charakterisierung der Propeptide von Cathepsin H und L	42

3.2.	Enzymkinetische Messungen	44
3.2.1.	Voruntersuchungen	44
3.2.2.	Inhibitionswirkung der Propeptide von Cathepsin H und von Cathepsin L gegenüber den Cathepsinen H, K, L und S	46
4.	Diskussion	61
5.	Literatur- und Quellenverzeichnis	71
	Danksagung	78
	Ehrenwörtliche Erklärung	79
	Lebenslauf	80

AMC	7-Amino-4-Methyl-Coumarin
APS	Ammonium Persulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
Da	Dalton
dATP	desoxy Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy Guanidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nucleotidtriphosphat
dTTP	desoxy Thymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
FE	Fluoreszenzeinheiten
g	Erdbeschleunigung
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
hpp CatH	Propeptid vom humanen Cathepsin H
hpp CatK	Propeptid vom humanen Cathepsin K
hpp CatL	Propeptid vom humanen Cathepsin L
hpp CatS	Propeptid vom humanen Cathepsin S
IPTG	Isopropyl- β -D-Galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni
Leu	Leucin
MG	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Phenylalanin
PP	Probenpuffer
U/min	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	N`N`N`N` - Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylgalactosid
Z	Benzyloxycarbonyl

Zusammenfassung

Meine Arbeit ist ein Beitrag zu einer umfassenden systematischen Studie unter optimalen und standardisierten Bedingungen zur Selektivität der Hemmwirkung von Propeptiden der Papainfamilie. Zu dieser Frage gab es Vorarbeiten in der betreuenden Arbeitsgruppe, auf denen ich aufbauen konnte. Zwei rekombinante Propeptide und die entsprechenden Inhibitionsdaten standen bereits zur Verfügung. Drei weitere Propeptide habe ich gentechnisch hergestellt, charakterisiert und die Hemmwirkung gegenüber den Cathepsinen L, H, K und S gemessen. Alle untersuchten Enzyme gehören zur Unterfamilie der Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen. Deren Stammbaum (Schema 1) zeigt, dass Cathepsin H einen großen evolutionären Abstand zu den übrigen Mitgliedern hat. Bei seiner Prozessierung bleibt ein Teil der Prosequenz als sogenannte Minikette kovalent gebunden in der Substrat-bindenden Spalte zurück und ist für seine Aminopeptidase-Spezifität verantwortlich. Funktionsuntersuchungen zum Propeptid von Cathepsin H sind bisher nicht publiziert worden. Demgegenüber gab es mit dem Propeptid von Cathepsin L schon Hemmstudien, allerdings mit einer verkürzten Sequenz.

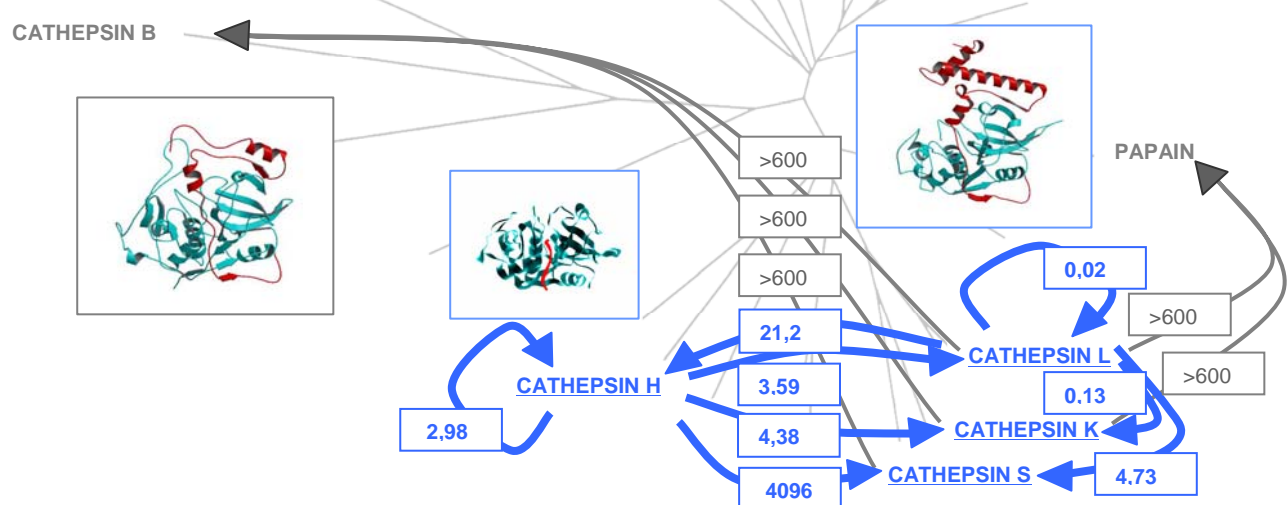
In insgesamt zwölf aufwändigen Über-Kreuz-Experimenten habe ich aus Inhibitionskinetiken den Hemmtyp sowie K_i - und, wo es möglich war, auch k_{off} -Werte ermittelt. Ich benutzte kinetische Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten.

Ein Teil meiner Messreihen bestätigte aufgrund von Literaturdaten erwartete Ergebnisse, interessante Schlussfolgerungen ergaben sich aus den drei nachfolgenden Befunden:

1. Da Propeptide kompetitive Inhibitoren sind, also im aktiven Zentrum angreifen, könnte die dort befindliche Minikette des Cathepsin H die Propeptid-Bindung behindern. Um das zu prüfen, habe ich bei diesem Enzym zwei Propeptid-Konstrukte hergestellt, eines ist so weit verkürzt, dass eine Wechselwirkung mit der Minikette nicht zu erwarten ist. Beide Formen zeigten von allen untersuchten Propeptiden die geringste Hemmwirkung, sowohl gegenüber dem Mutterenzym als auch gegenüber den drei anderen Enzymen der Unterfamilie. Sie unterschieden sich aber deutlich im Hemmmechanismus.
2. Der K_i für die Hemmung von Cathepsin L durch sein Propeptid beträgt 18 pM, das ist der niedrigste bisher gemessene Wert in der ganzen Papainfamilie und liegt in der Größenordnung der besten in der Natur vorkommenden Inhibitoren. Beim Cathepsin L ist deshalb eine perfekte Co-Evolution zwischen dem Enzym und seinem Propeptid zu vermuten.

3. Das Propeptid von Cathepsin K inhibiert das Mutterenzym schlechter als andere Enzyme dieser Familie (negative Selektivität), der K_i -Wert ist 630 pM. Es ist zu vermuten, dass sich im Verlauf der Evolution beim Cathepsin K die Enzym-Region stärker verändert hat als die Pro-Region. Letztere könnte die Eigenschaften eines gemeinsamen Vorläufers behalten haben, passt inzwischen aber nicht mehr 100%ig zum Mutterenzym.

Das Konzept und die wichtigsten Ergebnisse meiner Arbeit (blau) sind im Nachfolgenden vor dem Hintergrund bekannter Daten zur Struktur (Procathepsin B, Cathepsin H und Procathepsin L, rot) jeweils die Propeptide bzw. die Minikette), zu den Verwandtschaftsbeziehungen (Stammbaum, hellgrau) und zur Selektivität der Hemmwirkung der Propeptide (Guay et al., 2000, dunkelgrau) dargestellt. Man erkennt den Zusammenhang zwischen Evolution, Struktur und Funktion ausgewählter Propeptide der Papainfamilie. Die Pfeile symbolisieren jeweils die Richtung (sie gehen vom Propeptid aus und zielen auf das gehemmte Enzym) und das Ergebnis (K_i in nM) der Hemmversuche. Alle Daten entstammen den Abbildungen 1 und 23, dem Schema 1 und der Tabelle 10 der nachfolgenden Arbeit.



Die Daten zur Selektivität der Hemmwirkung der Propeptide in der Papainfamilie sind eine Voraussetzung, um den Zusammenhang zwischen den geringfügigen Strukturunterschieden zwischen den Zymogenen der Papainfamilie und den zum Teil erheblichen Funktionsunterschieden einzelner Molekülbereiche erkennen und verstehen zu können. Das ist Teil der Grundlagenforschung und Voraussetzung für die computer-gestützte Entwicklung von selektiven Inhibitoren für einzelne Vertreter dieser Proteasefamilie, die bei einigen epidemiologisch bedeutsamen Erkrankungen wie Pankreatitis, rheumatoider Arthritis, Osteoporose und bei manchen malignen Tumoren in beträchtlich erhöhter Aktivität zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen.

1. Einleitung

Cathepsine sind meist in Lysosomen vorkommende Proteasen und somit an Um- und Abbauprozessen von Proteinen beteiligt. Lysosomen sind vesikuläre Organellen, die zelleigenes oder endozytiertes Material zur Wiederverwendung abbauen. In ihrem Lumen befinden sich eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, wie z.B. Proteasen, Nukleasen, Glykosidasen und Lipasen. Transportproteine in der Lysosomenmembran sorgen für den Eintransport von Protonen zur Einstellung eines pH-Wertes von etwa 5 und für die Abgabe der Endprodukte ins Zytosol (Alberts et al., 1994). Cathepsine sind aber nicht nur an lysosomalen Verdauungs- und Abbauprozessen beteiligt, sondern auch an limitierten Proteinspaltungen oder Prozessierungen in speziellen Kompartimenten bestimmter Zellen, beispielsweise bei der Herstellung der Peptidfragmente in den Endosomen MHC Klasse II-antigenpräsentierender Zellen. Auch extrazelluläre Proteolyse durch Cathepsine ist bekannt: Thyreoglobulin in den Follikeln der Schilddrüse wird durch Cathepsin B (Linke et al., 2002) abgebaut, die organische Knochenmatrix durch Cathepsin K (Gelb et al., 1996; Hou et al., 1999).



Procathepsin L

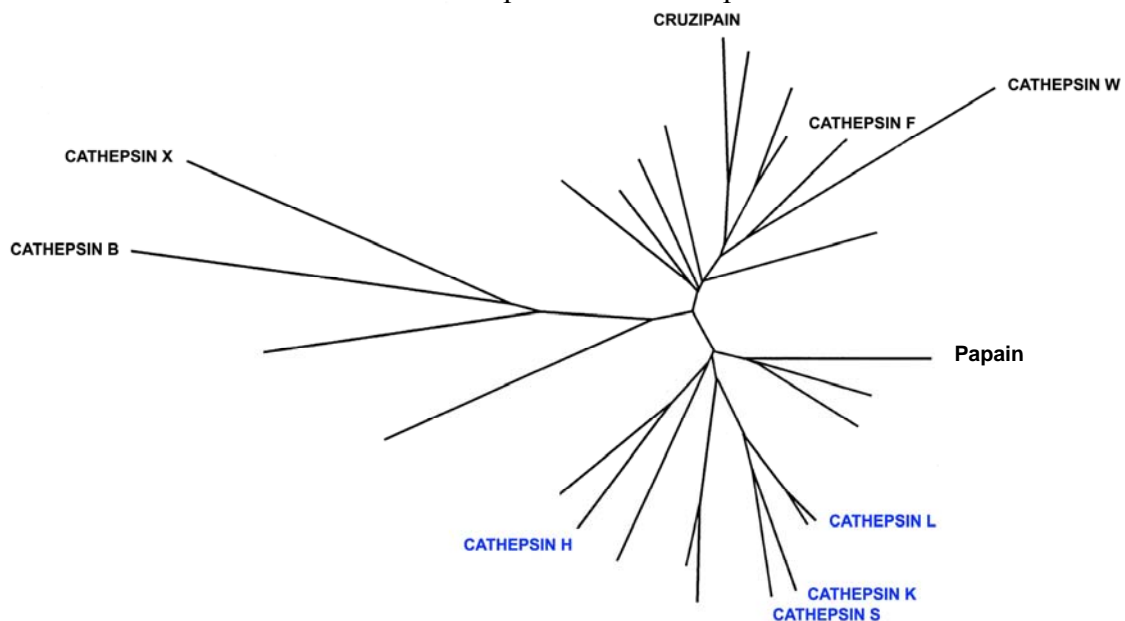


Cathepsin H

Abb. 1: Strukturmodell des humanen Procathepsin L und des Cathepsin H vom Schwein.

Die dreidimensionale Struktur sowie die Kodierung der Enzyme wurden aus der SWISS Prot Datenbank entnommen. Die Bearbeitung von Procathepsin L (1CS8) und Cathepsin H (8PCH) erfolgte mit Hilfe des Programms Rasmol. Am N-Terminus des Procathepsin L befindet sich die kovalent gebundene Proregion, welche im Modell **rot** hervorgehoben ist. Sie verfügt über drei Helices, vertikal die α_1 -Helix, horizontal darunter die α_2 -Helix und wiederum unterhalb die α_3 -Helix. **Türkis** dargestellt sind die zwei Domänen der Peptidaseeinheit (=reifes Enzym), in denen sich das aktive Zentrum bei Cathepsin H mit dem **schwarz** hervorgehobenen Cysteinrest und die Minikette (interne Nummer 376-383), **orange** gekennzeichnet, befindet.

Die meisten Cathepsine, darunter alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten, haben einen Cysteinrest im katalytischen Zentrum, sind also Cysteinproteasen. Alle lysosomalen Cysteinproteasen gehören zur Papain-Familie, die in den einschlägigen Datenbanken (z.B. <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/> oder <http://merops.sanger.ac.uk>) die Abkürzung C1A trägt (Barrett et al., 2001). Dabei steht C für Cysteinprotease, A für den Clan, der die evolutionäre Verwandtschaft berücksichtigt und 1 für die Familienzugehörigkeit, die sich aus der Struktur des katalytischen Zentrums ergibt. Die Proteasen der Papainfamilie besitzen nicht nur die gleiche Struktur des katalytischen Zentrums, sondern auch eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur des reifen Enzyms (Abb. 1). Das reife Enzym, welches in der Merops Datenbank als Peptidaseeinheit bezeichnet wird, besteht grundsätzlich aus zwei Domänen, zwischen denen sich die Substratbindungsstelle mit der katalytischen Triade befindet. Papain war die erste Cysteinpeptidase, deren Struktur ermittelt wurde (Leusink et al., 1968). Inzwischen wurde die Struktur zahlreicher weiterer Enzyme dieser Familie aufgeklärt, in allen Fällen fand sich der gleiche Grundaufbau (Musil et al., 1991; Fujishima et al., 1997; Gunčar et al., 1998). Abbildung 1 illustriert das beispielhaft anhand der Strukturbilder von Procathepsin L und Cathepsin H.



Schema 1: Verwandtschaftsbeziehung innerhalb der C1A-Peptidasen

Cathepsin H, K, L und S (blau gekennzeichnet) gehören der Familie der L-ähnlichen Cysteinproteasen an, wobei sich Cathepsin H nicht im engen Verband der anderen Cathepsine befindet (Brinkworth et al., 2000).

Die Papain-Familie ist entwicklungsgeschichtlich sehr alt und umfasst Vertreter aus unterschiedlichen Organismenreichen, von Viren (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*) über Bakterien (*Fusobacterium nucleatum*), Amöben (z.B. *Crucipain*), Pflanzen (z.B.

Papain) bis zu den Säugetieren (z.B. Cathepsin L). Cysteinproteasen der Papainfamilie werden derzeit in drei Unterfamilien eingeteilt: die Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen (z.B. Cathepsine H, K, L, S und V), die Cathepsin B-ähnlichen (bei Säugetieren nur Cathepsin B) und die Cathepsin F-ähnlichen (Cathepsine F und W) (Santamaria et al., 1999; Wex et al., 1999). Es gibt aber auch Familienmitglieder, wie das Cathepsin X, die bisher noch keiner Unterfamilie zugeordnet wurden, obwohl in Schema 1 die Verwandtschaft mit dem Cathepsin B zu erkennen ist.

Die Peptidaseeinheit ist, wie schon erwähnt, immer sehr ähnlich aufgebaut, sodass sich die Zuordnung zu den Unterfamilien nach Größe und Struktur der Proregion richtet. Cathepsin B ist schon sehr lange bekannt und wurde bisher am häufigsten untersucht. Die Cathepsin L-ähnliche Untergruppe umfasst bei den Säugetieren die meisten Vertreter und eignet sich deshalb gut für vergleichende Studien, wie die von mir geplante.

In der Primärstruktur der eukaryotischen Vertreter der C1A- Familie kann man drei charakteristische Abschnitte unterscheiden, das sind vom N-Terminus beginnend: Signalsequenz (10-20AS), Prosequenz (38-250 AS) und Peptidaseeinheit (220-260 AS) (Wiederanders et al., 2003). Die Signalsequenz lenkt das Protein unter Vermittlung spezifischer Proteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und wird dort durch eine Signalpeptidase entfernt (Walter und Blobel, 1981).

Wenn Proregion und Peptidaseeinheit (noch) kovalent miteinander verbunden sind, bilden sie die inaktive Vorstufe der Peptidase und werden als Zymogen oder als Proenzym bezeichnet. Bei allen lysosomalen Cysteinproteasen liegt ein Abschnitt der Prosequenz so zwischen den beiden Domänen des Enzyms, dass der Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum sterisch verhindert wird, sie wirkt also als kompetitiver Inhibitor. Im Reifungsprozess wird die Proregion auto- oder heterokatalytisch gespalten und so vom aktiven Zentrum entfernt. Erst nach dieser als Prozessierung bezeichneter limitierter Proteolyse sind diese Cathepsine enzymatisch aktiv.

Proregionen erfüllen neben der gerade beschriebenen reversiblen Inhibition des jeweiligen Mutterenzyms noch weitere Funktionen: Sie werden für die korrekte Faltung der neu synthetisierten Enzyme (Foldasefunktion) und zur Stabilisation gegen Denaturierung durch den neutralen pH außerhalb der Lysosomen benötigt. Einzelne AS innerhalb der Proregion vermitteln die Anheftung an Membranrezeptoren, entweder direkt oder über kovalent gebundene Kohlenhydratseitenketten. Sie sind deshalb

manchmal auch für den Transport der Proenzyme zum Lysosom alleinverantwortlich (Nissler et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Proregion vieler Cysteinproteinasen diese Eigenschaft auch im freien, nicht-kovalent gebundenen Zustand, als sogenanntes Propeptid, behält. Die Proregionen hemmen also nicht nur im kovalent an das Mutterenzym gebundenen Zustand, sondern auch als isolierte Propeptide. (Fox et al., 1992; Carmona et al., 1996; Maubach et al., 1997; Fujishima et al., 1997; Visal et al., 1998; Billington et al., 2000; Guay et al., 2000)

Propeptide können peptidchemisch oder rekombinant hergestellt werden und sind in den letzten 15 Jahren zu einem oft genutzten Werkzeug im Studium der funktionellen Wechselwirkungen zwischen Proregion und Mutterenzym geworden. Das erste synthetisch hergestellte Propeptid, dessen Hemmwirkung im Detail untersucht wurde, war das des Cathepsin B (Fox et al., 1992). Inzwischen sind zahlreiche andere Propeptide gentechnisch hergestellt und auf ihre inhibitorische Wirksamkeit untersucht worden (Carmona et al., 1996; Billington et al., 2000; Guay et al., 2000). Anfänglich versprach man sich von diesen Untersuchungen Hinweise auf den für die Inhibition der Mutterenzyme entscheidenden Strukturbereich, um diese Erkenntnisse zur Herstellung von spezifischen Inhibitoren zu nutzen. Dieses einfache Konzept war aber nicht erfolgreich (Chen et al., 1996). Es zeigte sich rasch, dass nur vollständige oder weitgehend vollständige Propeptide ihre Mutterenzyme im nanomolaren Konzentrationsbereich hemmen (Carmona et al., 1996). Lediglich in einem Fall wurden Strukturdaten zur Wechselwirkung zwischen Enzym und Propeptid bei der Konstruktion eines Cathepsin L spezifischen Inhibitors berücksichtigt (Chowdhury et al., 2002). Vermutlich gab es aus diesem Grund in den letzten Jahren keine diesbezüglichen Publikationen mehr, statt dessen wurde versucht, die inhibitorische Wirkung von Propeptiden auf nahe oder entfernte verwandte Enzyme zu vergleichen. Die bisherigen Ergebnisse sprechen für einen gewissen Zusammenhang zwischen der evolutionären Verwandtschaft der Reaktanten und der Intensität der Hemmwirkung (Guay et al., 2000; siehe Abbildung 23). Solche Daten zur Spezifität der Hemmung erlauben bei Kenntnis der zugehörigen Raumstruktur der Proenzyme Schlussfolgerungen bezüglich des Struktur-Funktions-Zusammenhangs (Kaulmann et al., 2006). Die Aussagefähigkeit der bisherigen Publikationen ist aber zweifach begrenzt, denn nur von einigen Enzymen standen die Propeptide vollständig zur Verfügung und, da nicht alle Messungen im gleichen Labor erfolgt sind, unterschieden

sich die Reaktionsbedingungen zum Teil erheblich (Schlabrakowski, 2003). Besonders nachteilig erschien uns, dass das Propeptid des Cathepsin H nicht in solche Untersuchung einbezogen wurde, denn Cathepsin H nimmt in der Unterfamilie der Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen in zweifacher Hinsicht eine Sonderstellung ein.

1. Obwohl alle Cysteinproteasen den gleichen Katalysemechanismus aufweisen, gibt es erhebliche Unterschiede bezüglich der Lokalisation der Spaltstelle im Substratprotein. Man findet aufgrund struktureller Unterschiede der Substratbindungsstelle bei den lysosomalen Cysteinproteinasen unterschiedliche proteolytische Aktivitäten: Cathepsin L, K und S trennen Substrate endoproteolytisch, die Cathepsine B und X sind vorzugsweise Carboxypeptidasen und Cathepsin H ist die einzige Aminopeptidase (Koga et al., 1992; Takahashi et al., 1988). Die Vorstellungen über den Feinmechanismus der Aminopeptidaseaktivität berücksichtigen, dass Cathepsin H, im Unterschied zu Papain und den anderen Mitgliedern der Cathepsin L-ähnlichen Familie, zusätzlich eine sogenannte „Minikette“ besitzt, die einen Teil der substratbindenden Spalte blockiert. Sie entsteht bei der Prozessierung aus der Proregion und ist über eine Disulfidbrücke mit dem Mutterenzym verbunden. Die negative Ladung der terminalen Carboxylgruppe der Minikette sorgt für die Verankerung der terminalen Aminogruppe des Substrates im richtigen Abstand vom katalytischen Zentrum (Gunčar et al., 1998; Baudys et al., 1991). Andererseits verhindert die „große“ Minikette den Zugang von Substrat-Proteinen zum aktiven Zentrum.
2. Die Proregionen aller Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen haben N-terminal eine Minidomäne, die im Wesentlichen aus zwei gekreuzten Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$) besteht, welche durch drei gestapelte Trp-Reste zusammengehalten werden (Kreusch et al., 2000). Sie bilden das strukturelle Rückgrat dieses Molekülabschnittes (Guo et al., 2000). An diesem Molekülrückgrat sind eine β -Schleife und eine kurze β -Faltblattstruktur gebunden. Die Supersekundärstruktur verankert das Propeptid an der Propeptid-bindenden Schleife des reifen Enzyms (Pietschmann et al., 2002).

Beim humanen Procathepsin H sind zwei der strukturbestimmenden Trp-Reste, je einer in der $\alpha 1$ und der $\alpha 2$ Helix, durch Phe ersetzt. Das ist typisch für Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteasen aus niederen Organismen. Darüber hinaus ist die Primärstruktur des Cathepsin H Propeptids wenige AS kürzer als andere Cathepsin L-ähnliche Propeptide. Das in Abb. 2 gezeigte Alignment legt die von Schlabrakowski veröffentlichte

Vermutung nahe, dass die $\alpha 2$ Helices am C-terminalen Ende um eine Windung (ca. 4 AS) verkürzt ist. Das würde erklären, warum die Propeptide der Cathepsine K, L und S keine solch stabilen Komplexe mit Cathepsin H wie mit den eigenen Mutterenzymen bilden können (Schlabrakowski, 2003).

	1p	10p	20p	30p	40p	50p	60p	
Cathepsin L	TLTFDHSLEAQ	WTKWK	KAMHN-RLYG-	MNEEGWRR	AVWEKNM	KMIELHNQ	EYREGKHS	SFTM
Cathepsin S	QLHKDPTLDH	HWHLW	KKTYG-KQY	KEKNEEA	VRRLIWE	KNLKFV	MLHNLE	HSMGMH
Cathepsin K	-LYPEEILD	THWELW	KKTHR-KQY	NNKVDEI	SRRLIWE	KNKLYI	SIHNLE	ASLGVHT
Cathepsin H	ELSVNSLEK	FHF	FKSW	MSKHR-KT	YSTE-EY	HRLQT	FASNWR	KINAHN-NGN---HTFKM
		70p	80p	90p	96p			
Cathepsin L	AMNAFGDM	TSEEFRQ-	VMNGFQ	NRKPRK	GKVFQE	PLFYE		
Cathepsin S	GMNHLGDM	TSEEVMS-	LMSSLR	VPSQWQ	RNITYK	SNPNRI		
Cathepsin K	AMNHLGDM	TSEEVVQ-	KMTGLK	VPLSHS	RSNDT	LYIPEW	EGR	
Cathepsin H	ALNQFADM	SFAEIK	HKY	LWSE	PQNC	SATKSN	YLRGTGP	

Abb. 2: Sequenzabfolge der Propeptide ausgewählter Cathepsin-L ähnlicher Cysteinproteasen

Als Grundlage für die Nummerierung diente die Sequenz der Cathepsin L Proregion. Das stabilisierende Strukturmotiv aus drei aromatischen AS ist **rot**, die Minikette beim Propeptid vom Cathepsin H ist 8 AS groß und **blau** dargestellt. **Grau unterlegt** sind die $\alpha 2$ Helices der Proregionen – die von Cathepsin H ist 4 AS kürzer als die anderen.

Propeptide von L-ähnlichen Cathepsinen sind der Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe. Ausgehend von Experimenten zur Bedeutung des Propeptids von Cathepsin S als Inhibitor und Faltungshelfer für das Mutterenzym ist die systematische Erweiterung solcher Untersuchungen auf die gesamte Unterfamilie der Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen geplant. Das Ziel dieser Arbeit ist ein Verständnis der molekularen Mechanismen, die den beiden genannten wichtigen Teilfunktionen der Proregionen zugrunde liegen. Zum Teilproblem der Spezifität der Hemmwirkung von Propeptiden in der genannten Unterfamilie gab es schon Vorarbeiten: die inhibitorische Aktivität von drei rekombinant hergestellten Propeptiden (der Cathepsine K, L und S) wurde gegenüber vier Enzymen (Cathepsine H, K, L und S) getestet. Es fiel auf, dass das Propeptid vom Cathepsin L nur sein Mutterenzym, aber keines der verwandten Enzyme mit sehr hoher Affinität hemmte und Cathepsin H durch keines der geprüften Propeptide mit sehr hoher Affinität gehemmt wurde. Bei der Untersuchung aller übrigen Kombinationen wurde jeweils eine langsame hochaffine Hemmung in Ein-Schritt-Reaktionen mit sehr geringem K_i -Wert beobachtet (Schlabrakowski, 2003).

Die Aufgabenstellung für diese Arbeit resultierte aus den Lücken dieser Studie, denn es gelang damals nicht, das Propeptid vom Cathepsin H zu exprimieren, so dass kein Bezugswert zur Interpretation der eben genannten Inhibitionsstudien mit den

verwandten Propeptiden gegenüber Cathepsin H existierte. Das Propeptid von Cathepsin L war damals der Arbeitsgruppe von slowenischen Kollegen nur in kleiner Menge für Vorversuche überlassen worden, weshalb eine detaillierte Untersuchung der teilweise sehr ungewöhnlichen Inhibitionskinetiken gegenüber den verwandten Enzymen (z.B. Vermutung einer unvollständige Hemmung) nicht möglich war.

2. Materialien und Methodik

2.1. Materialien

2.1.1. Antibiotika, Chemikalien, Enzyme, Standards und Substrate

Material	Vertreter	Hersteller
Antibiotika	Ampicillin	Roth
	Chloramphenicol	Roth
	IPTG	Roth
	Kanamycin	Sigma
	Tetracyclin	Sigma
Enzyme (allgm.)	DNAse	Roche
	Pfu-Polymerase	Fermentas
	Taq-Polymerase	Invitrogen
	T4-DNA-Ligase	Fermentas
	Trypsin	SIGMA
Restriktionsenzyme	BamHI	GIBCO
	EcoR I	Fermentas
	Hind III	Fermentas
	NdeI	Fermentas
Cathepsine, humane	Cathepsin H, aus der Leber	Calbiochem
	Cathepsin L, rekombinant	Calbiochem
	Cathepsin K, rekombinant; wurde uns von D. Brömme zur Verfügung gestellt; Ass. Prof. Dept. Hum. Genetics; Mount Sinai School of Medicine; Fifth Avenue at 100th Street; New York 10029.	
	Cathepsin S, rekombinant; wurde in der eigenen Arbeitsgruppe durch Expression des Procathepsin S in <i>E. coli</i> hergestellt (Kramer, 2005).	
Substrate	H-Arg-AMC	Bachem GmbH
	Z-Leu-Arg-AMC	Bachem GmbH
	Z-Phe-Arg-AMC	Bachem GmbH
	Z-Val-Val-Arg-AMC	Bachem GmbH
Propeptide	Die rekombinanten Propeptide von Cathepsin H und L wurden in unserer Arbeitsgruppe hergestellt.	
Molekulargewichts- Standards für SDS- Polyacrylamid- und Agarosegel- elektrophorese	Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas
	PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas
	Bench Mark™ Pre-Stained Protein Ladder (5,9-177,3 kDa)	Invitrogen
	Bench Mark™ Protein Ladder (10-220 kDa)	Invitrogen
	Mark 12™ Wide Range Protein Standard (2,5-200 kDa)	NOVEX™

	See Blue [®] Plus 2 Prestained (4-250 kDa)	Invitrogen
Eichproteine für	Cytochrom C (12384 Da)	SIGMA
MALDI-TOF	Standard 3 (5730 Da Insulin, 11674 Da Thioredoxin, 16955 Da Apomyoglobin)	SIGMA
Chemikalien	Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad pro analysi.	

2.1.2. Kits zur Bearbeitung von DNA

Plasmidisolierung	NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel
Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Klonierung	TOPO [®] TA Cloning Kit	Invitrogen

2.1.3. Verwendete Vektoren und Bakterienstämme

Bakterienstämme

E. coli BL21(DE3)pLysS (Intvitrogen)/ Expressionsstamm

Dieser Stamm ist für die Expression von T7-Promotor regulierten Genen geeignet. Er trägt das Lysogen des Bakteriophagen λ DE3 und enthält eine Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines LacUV5-Promotors. Die Zugabe von IPTG induziert die Expression der T7-RNA-Polymerase und die Expression des Plasmidkonstrukts.

Der Genotyp ist beschrieben durch: F^- , *ompT hsdSB* ($r_B^-m_B^-$) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R).

E. coli TOP 10 (Intvitrogen)/ Klonierungsstamm

Mit diesem Stamm ist eine Klonierung und eine Blau-Weiß-Selektion ohne IPTG möglich.

Der Genotyp lautet: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139(ara-leu)7697 galU galK rpsL$ (Str^R) *endA1 nupG*.

Vektoren

pRSET-B (Invitrogen)/ Expressionsvektor

pRSET-B ist ein kommerzieller Vektor von 2,9 kb, der unter der Kontrolle des T7-Promotors die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* ermöglicht. Er besitzt einen N-terminalen His-tag, eine T7 Gen 10 Sequenz und einen Anti-Xpress Antibody Epitop Bereich, die nach der Reinigung durch Enterokinase-Verdau wieder abspaltbar sind. Mit diesem Vektor konnte bereits das Propeptid des humanen Cathepsin W exprimiert werden (S. Schüler und I. Wenz).

pCR 2.1 TOPO (Invitrogen)/ Klonierungsvektor

Der linearisierte Vektor pCR 2.1 TOPO verfügt über einzelne 3'-Desoxythymidin-Überhänge und eine kovalent gebundene Topoisomerase I. Für eine effiziente Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor wurde die intrinsische terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase genutzt. Sie fügt einzelne überhängende Desoxyadenosin (dA)-Reste an das 3'-Ende der PCR-Produkts an, welche mit den dT-Überhängen der Vektors paaren können.

2.1.4. Geräte

Allgemeine Labortechnik

Lamin Air [®] HVR 2448 Luftabzugshaube	Heraeus Instruments
Mikrowellenherd	AEG
pH-Meter CG 840	SCHOTT
Power Pac 200 Stromversorgungsgerät	BIO-RAD
Thermoblock DB 2A	Techne
Vortex-2 [™] Genie	Scientific Industries

Elektrophorese

Agarosegelelektrophoresekammern	Werkstatt des Instituts
FLUO LINK UV-Transilluminator	Biometra
ImageMaster [™] 1D Gel-Fotoapparatur	Pharmacia Biotech
Mini-PROTEAN II, SDS-Elektrophorese-System	Biorad
Model 583 Gel Dryer	BIO-RAD

Expression

DNA-Sequenzierer LI-COR 4000L	MWG Biotech
L-70 Ultrazentrifuge	Beckman Optima
MIKRO 22 R Zentrifuge	Hettich
Rotary Mixer	LABINCO
Schüttelinkubator Typ 3032/ 3033	GFL [®]
Sonopuls UW 70 Ultraschall	Bandelin Electronic
Sorvall [®] RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Du Pont Instruments
Spectralphotometer Sumal PE	Zeiss

Reinigung / Charakterisierung / Kinetische Messungen

Biofuge pico	Heraeus
DU [®] -70 Spectrophotometer	Beckman Coulter
FPLC-Anlage mit Gelchromatographiesäule,	
HiLoad Superdex-G75 16/60	Pharmacia Biotech
LS 50 B Spektralfluorometer	Perkin Elmer

2.1.5. Spezielle Computerprogramme

DNA-Star, Inc.	Lasergene
Prism	GraphPad
ProtParam tool	ExPASy

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Amplifizierung der Proregionen von Cathepsin H und L mittels PCR

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammenpipettiert:

Tabelle 1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation der cDNA von den Propeptiden von Cathepsin H (hpp CatH) kurz und Cathepsin L (hpp CatL).

	Ansatz für hpp CatH	Ansatz für hpp CatL
Template- DNA	0,5 µl pTriEx-1 hppCatH (10 ng)	1µl pcDNA 3.1 hCatL (p308) (10 ng)
10 mM dNTP-Mix	2 µl	1,5 µl
Primer sppCatHNde I (10 µM)	10 µl	3,25 µl
Primer asppCatHHIND III (10 µM)	10 µl	3,25 µl
10xPCR- Puffer mit MgSO₄ (20 mM)	10 µl	7,5 µl
Wasser (entionisiert)	76,5 µl	56,75 µl
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl FERMENTAS)	1 µl	0,75 µl
Gesamtvolumen	100 µl	75 µl

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, wurde der Vektor pTriEx-1 (A. Schlabrakowski), in dem sich die Propeptidsequenz des humanen Cathepsin H befand, bei der PCR als Template verwendet. Der Vektor pcDNA 3.1 hCatL (p308) enthielt die komplette cDNA-Sequenz des humanen Procathepsin L und wurde in unserer Arbeitsgruppe von A. Abulizi konstruiert.

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der PCR-Primer für das kurze und lange Propeptid von Cathepsin H und für das Propeptid von Cathepsin L

Propeptid	Strang	Sequenz	Markierte Schnittstelle
CatH (kurz)	sense	5'-G <u>CAT ATG</u> GCC GAA CTG TCC GTG-3'	Nde I
	antisense	5'-GA <u>AGC TTA</u> TGA CCA GAG ATA CTT GTG-3'	Hind III
CatH (lang)	sense	5'-G <u>CAT ATG</u> GCC GAA CTG TCC GTG-3'	Nde I
	antisense	5'-GGA <u>AGC TTA</u> GGG ACC AGT ACC TCG- 3'	Hind III
CatL	sense	5'-CGC <u>ATA TGA</u> CTC TAA CAT TTG ATC A-3'	Nde I
	antisense	5'-CGA <u>AGC TTA</u> CTC ATA AAA CAG AGG T-3'	Hind III

Um das Propeptid des humanen Cathepsin H in den Expressionsvektor pRSET-B zu klonieren, sind nachfolgende Primer mit künstlich eingeführten Restriktionsschnittstellen gewählt worden. Die jeweiligen PCR-Primerpaare sind in Tabelle 2 zusammengestellt, wobei die Erkennungssequenzen *kursiv*, das Startcodon ATG sowie die Stoppreion **fettgedruckt** dargestellt sind.

Im PTC-100™ Programmable Thermal Controller wurden folgende Reaktionszyklen durchlaufen:

Schritt/ Abfolge	Dauer	Temperatur in °C	Zyklen
1. Denaturieren	3 min	95	1
2. Annaeling	45 sek	48	} 30
3. Elongation	1 min	72	
4. Denaturieren	20 sek	95	
5. Annealing	45 sek	48	
6. terminale Elongation	10 min	72	1
7. Abkühlen	auf	4	1

2.2.2. DNA-Trennung im Agarosegel und Extraktion

Die Trennung der PCR-Produkte bzw. der Produkte des Restriktionsverdaus erfolgte mit Hilfe eines 1 %igen Agarosegels. Dazu wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE-Puffer erhitzt und nach der Abkühlung mit 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in dafür geeignete Agarosegelkammern gegossen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 Volt und dauerte circa 45 min.

Nach dem Protocoll des QIAquick Gel Extraction Kit wurden die DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung aus dem Gel isoliert. Nach vollständiger Aufarbeitung konnte man die Konzentrationen mit dem GeneQuant II RNA/DNA Calculator ermitteln.

Eine $OD_{260} = 1,0$ entspricht 50 µg/ml DNA.

2.2.3. Klonierung, Ligation, Transformation und DNA-Isolierung

Das Restriktionsenzym Nde I schneidet problemlos innerhalb einer Sequenz, jedoch nicht am Endstück eines PCR-Produktes. Um ein exaktes Schnittverhalten zu gewährleisten, wurde das PCR-Produkt in einen Hilfsvektor (pCR 2.1 TOPO) einkloniert und mit EcoR I geschnitten. Dieses Restriktionsenzym schneidet zwei Mal, 11 bzw. 6 AS vom PCR-Produkt entfernt, innerhalb der multiplen cloning site.

Bevor man das DNA-Fragment in den Vektor pCR 2.1 TOPO einfügen konnte, mussten A-Überhänge, wie unter 2.1.3. beschrieben, an das PCR-Produkt angebracht werden. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3: PCR-Ansatz zur Anheftung der A-Überhänge an das PCR-Produkt

PCR-Produkt (ca. 30-60 ng/μl)	2 μl
MgCl₂ (50 mM)	0,4 μl
PCR-Puffer (10 x)	1 μl
dNTP's (je 10 mM)	0,25 μl
Taq-Polymerase (5 U/μl)	0,1 μl
Wasser (entionisiert)	6,25 μl
Gesamtvolumen	10 μl

Im PCR-Cycler verblieb der Ansatz bei 72°C und für 15 min. Danach wurde er auf Eis gelagert und am selben Tag weiterverwendet.

Das nun mit A-Überhängen versehene DNA-Fragment fügte ich mit dem Vektor pCR 2.1 TOPO und einer Salzlösung zusammen. Die vektorassoziierte Topoisomerase verbindet das DNA-Fragment mit dem linearisierten Vektor nach Vorschrift des TOPO[®] TA Cloning Reaction and Transformation Kits. Das resultierende Plasmid wurde anschließend nach Vorschrift in *E.coli* TOP 10 transformiert und auf Agarplatten (LB, 100 μg/ml Ampicillin, 40 μg/ml X-Gal) ausplattiert.

LB - Medium	10 g/l Trypton, 10 g/l Natriumchlorid, 5 g/l Hefeextrakt pH 7,0 – 7,2
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l Natriumchlorid, 20 mM Glukose, 10 mM Magnesiumchlorid bei pH 7,0
LB - Agarplatten	15 g Bacto-Agar/l LB-Medium

Der autoklavierte Agar wurde in der Mikrowelle auf ca. 70-80°C erhitzt und verflüssigt. Danach kühlte die Lösung auf ca. 40°C unter der Laminar Box ab, ich gab 100 μg/ml Ampicillin hinzu und konnte nun den Agar in Petrischalen füllen. Die Agarplatten wurden ca. 20 min unter der Laminarbox getrocknet und dann weiterverwendet.

Für den einfachen farblichen Nachweis der einwandfreien Transformation des hpp CathH in den Vektor wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt.

Dieses System beruhte darauf, dass das Gen für die β -Galaktosidase in zwei Fragmente zerlegt wird: der N-terminale Teil (α -Fragment) ist auf dem Plasmidvektor codiert, der C-terminale Teil (ω -Fragment) liegt auf dem Bakterienchromosom verankert. Für die Aktivierung der β -Galaktosidase war eine gleichzeitige Expression beider Fragmente notwendig. Die entsprechenden Zellen bzw. Kolonien verfärbten sich dann in der Gegenwart des β -Galaktosidase-Substrates X-Gal blau.

Wenn sich das Insert im Plasmid befand, wurde der Leserahmen für das α -Fragment bildende Gen unterbrochen und die β -Galaktosidase blieb inaktiv. Die galaktosidische Bindung des Substrates X-Gal konnte dann nicht gespalten werden und die Kolonien blieben weiß.

Nach der Selektion erfolgte die Plasmid-DNA-Isolation aus *E.coli* TOP 10 im analytischen Maßstab nach Vorschrift (NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel).

Durch Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA (Tabelle 4) konnte zwischen Klonen mit einem PCR-Insert der erwarteten Größe und falschpositiven Klonen unterschieden werden. Die darauffolgende Sequenzierung (siehe 2.2.4.) bestätigte die Identität und korrekte Klonierung der Inserts.

Restriktionsverdau (analytisch)

Durch den Restriktionsverdau (Tabelle 4) konnten die Größe des PCR-Inserts kontrolliert und die Schnittstellen eindeutig nachgewiesen werden.

Restriktionsverdau (präparativ)

Zur späteren Aufbereitung im präparativen Verdau (Tabelle 4) wurden die sequenzierten Klone genutzt.

Anschließend wurden die Propeptid-codierenden Inserts in den Expressionsvektor pRSET-B umklont. PRSET-B, sowie mit den gleichen Restriktionsenzymen Hind III und Nde I verdaut, um zum einen den einzufügenden Abschnitt genau definieren zu können – aufgrund der Klonierung in pCR 2.1 TOPO waren 17 AS zu viel am Insert. Zum anderen fügten sich die Enden sowohl des Inserts als auch des Expressionsvektors problemlos aneinander, sodass eine exakte Ligation ermöglicht werden konnte.

Tabelle 4: Zusammensetzung des analytischen und präparativen Restriktionsverdaus für hpp CatH und hpp CatL

	Verdau von hpp CatH und hpp CatL	
	analytisch	präparativ
pCR 2.1 TOPO	3 µl (ca. 300 ng/µl)	18 µl (ca. 300 ng/µl)
Hind III (10 U/µl)	0,3 µl	3 µl
Nde I (10 U/µl)	0,3 µl	1,5 µl
Puffer R (10 x)	2 µl	-
Y+-Tango-Puffer (Fermentas 10x)	-	3 µl
Wasser (entionisiert)	4,4 µl	4,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl	30 µl

Die Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und auf ein Agarosegel zur Analyse aufgetragen.

Tabelle 5: Ligationsansatz für das Propeptid des Cathepsin H und L. Verwendung von Vektor : Insert im molaren Verhältnis 1 : 3.

	hpp CatH	hpp Cat L
hpp CathH	5 µl (34 ng)	5 µl (44 ng)
pRSET-B	1,5 µl (150 ng)	
T4-Puffer (10x)	4 µl	
T4-DNA-Ligase (5Weiss U/µl)	1 µl	
Wasser (entionisiert)	28,5 µl	
Gesamtvolumen	40 µl	

Der in Tabelle 5 beschriebene Ansatz wurde im Thermo-Cycler 1 h bei 22°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Ligase für 10 min auf 65°C erhitzt.

Es erfolgte die Transformation des mit dem Propeptid-codierenden Insert beladenen Expressionsvektor pRSET-B in den Bakterienstamm TOP 10, wobei 20 µl des Ligationsansatzes zu 100 µl der kompetenten Zellen hinzugegeben und für 10 min in Eis aufbewahrt wurden. Nach 45 sek Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad kamen die Zellen erneut aufs Eis. Unter sterilen Bedingungen wurden 500 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37°C im Schüttler belassen. Die transformierten Bakterienlösungen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten (LB, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und für ca. 10 h im Brutschrank bei 37°C belassen.

Wie für die Klonierung in den Vektor pCR 2.1 TOPO bereits beschrieben (Seite 21) wurde die Plasmid-DNA ausgewählter Klone isoliert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert. Nach demselben Ablauf wurden positive Klone in den Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert. Hierfür wurde 1 µl Plasmid-DNA (ca. 100-200 ng) des Ligationsansatzes verwendet und den Agarplatten 50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt.

2.2.4. DNA-Sequenzanalyse

Die Basenfolge der Propeptid-DNA wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Das Verfahren basiert auf einer Kombination von PCR und eines zufälligen Didesoxynukleotid-Kettenabbruchs innerhalb der Kette. Es wurde der SequiTherm™ Long-Read™ Cycle sequencing Kit mit dem entsprechenden Sequenzierprimer (Tabelle 6) verwendet.

Tabelle 6: Sequenz und Bezeichnung der Primer für pCR 2.1 TOPO und pRSET-B.

Vektor	Primerbezeichnung	Annealing-temperatur (in °C)	Sequenz
pCR 2.1	IR 8	55	5'- GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
TOPO	IR 9	55	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
pRSET-B	IR 20	38	5'- TAA TAG GAC TCA CTA TAG GG-3'

Die Sequenzier-PCR-Reaktion lief nach dem folgenden Protokoll:

Schritt	Dauer	Temperatur (in °C)	Zyklen
Hot Start	5 min	95	1
Denaturierung	15 sek	94	} 25
Annealing	15 sek	55	
Synthese	30 sek	72	
Kühlen	5 min	4	1
Zugabe der Stop-Solution			
Denaturierung	5 min	72	1
Kühlen	5 min	4	

Die Sequenzierung wurde nach dem Standardprotokoll für 41 cm Gele mit dem LI-cor 4000L Sequenzer durchgeführt. Mit dem Programmen Base ImagIR und Lasergene (DNASTAR INC.) konnte man die Sequenzierreaktionen und -dateien auswerten.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Expression und Reinigung der rekombinanten Propeptide

Bakterielle Expression

HUN-Puffer	8 M Harnstoff, 200 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 8,0
Puffer D	50 mM Na-acetat, 6 M GndHCl, pH 4,5
Puffer S	250 mM D(+)-Saccharose, 10 mM Tris/ HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Puffer V	10 mM Tris/ HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Puffer W	100 mM Tris/ HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Puffer X	100 mM Tris/ HCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, pH 8,0

Die Produktion der gewünschten Proteine durch die transformierten Bakterien wurde durch eine Probeinduktion im analytischen Maßstab untersucht. Dazu wurden 25 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol versetzt und mit einer Einzelkolonie oder 50 µl einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nachdem eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht worden war, wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Um die Proteinexpression beurteilen zu können, wurden unmittelbar vor der Induktion und danach im Abstand von je einer Stunde 1 ml der Kultur entnommen und zentrifugiert (1 min, 4°C, 20000 x g). Die Pellets wurden in 100 µl PBS resuspendiert, insgesamt drei Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad von 42°C wieder aufgetaut. Nach 10 minütiger Zentrifugation (4°C, 20000 x g) wurden dem unlöslichen Protein entsprechend dem Ausgangsvolumen 1 x Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 7) zugegeben. Der Überstand wurde mit 100 µl 2 x Probenpuffer resuspendiert. Nach Aufarbeitung der löslichen und unlöslichen Bestandteile und anschließender Denaturierung im Wasserbad (5 min, 95°C) konnte mittels SDS-Page eine Analyse der Proteine durchgeführt werden.

Im präparativen Maßstab wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml Vorkultur versetzt und in gleicher Weise wie die analytischen Proben inkubiert und induziert. Die Zellernte

erfolgte ca. 3 Stunden nach der Induktion durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C, 9000 U/min (Sorval GSA). Die Sedimente wurden in 4 ml Puffer W resuspendiert. Nach Einfrieren und Auftauen wurde eine Spatelspitze DNase zugesetzt und 30 min lang unter ständiger Durchmischung mit einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der vollständige Zellaufschluss erfolgte anschließend durch Ultraschallbehandlung (3 x 2 min mit 60% der maximalen Intensität) im Eisbad.

Durch Zentrifugation bei 9000 U/min für 10 min bei 4°C wurden die unlöslichen Einschlusskörperchen, die die überexprimierten Propeptide enthielten, von den löslichen Proteinen getrennt. Die Sedimente wurden mit 2 ml Puffer X resuspendiert und bei 4°C für 30 min inkubiert. Nach diesem Waschschriff wurde nochmals zentrifugiert und die Einschlusskörperchen in 2 ml Puffer S aufgenommen.

2.3.2. Reinigung der Einschlusskörperchen durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Es wurden je eine 40- und eine 70 %ige (w/w) D(+)-Saccharose-Lösung in Puffer V hergestellt und mit einem Gradientenmischer in Zentrifugenbecher gefüllt, sodass stabile lineare Rohrzuckergradienten (36 ml pro Becher) entstanden. Diese wurden vorsichtig mit je 2 ml der in Puffer S resuspendierten Einschlusskörperchen überschichtet. Nach dem Austarieren durch Zugabe von Puffer S erfolgte die Ultrazentrifugation bei 28000 U/min 2 h bei 4°C. Die Einschlusskörperchen sammelten sich dabei etwa am Übergang vom ersten zum zweiten unteren Drittel des Gradienten als deutlich sichtbare Bande von 0,5-1 cm Breite an. Zur Entnahme wurde eine kleine Öffnung in den Becherboden gestochen und die austropfende Flüssigkeit in Fraktionen von 1,5 bis 2 ml gesammelt. Die Trübung wurde photometrisch bei 600 nm gemessen und die Fraktionen mit der höchsten OD₆₀₀ vereinigt. Um den Rohrzucker weitgehend zu entfernen, wurde mit Puffer V stark verdünnt (mindestens 1:10), intensiv geschüttelt und anschließend zentrifugiert (30 min, 4°C, 31000 x g). Die sedimentierten Einschlusskörperchen wurden im Verhältnis von 100 mg Pellet zu 1ml denaturierenden Puffer D mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgelöst und anschließend resuspendiert.

2.3.3. Endreinigung des Propeptids durch Gelfiltration

Chromatografie-Medium 0,5 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Natrium-Acetat, 15 % Acetonitril, pH 4,5

Die Gelfiltration erfolgte im Kühlraum bei 4°C über eine HiLoad Superdex-G75 Säule 16/60. Die Flussrate des Chromatographie-Mediums betrug 2 ml/min, der Durchlauf wurde in 3 ml Fraktionen gesammelt. Um eine optimale Trennung zu erreichen, wurden maximal 2 ml Probe über eine Schlauchschleife auf die Säule aufgetragen. Aus diesem Grund musste vorher das Volumen der aufgelösten Einschlusskörperchen durch Ultrafiltration über eine Amicon YM 10 Membran entsprechend reduziert werden. Unmittelbar vor dem Auftrag erfolgte eine Zentrifugation (14000 U/min, 10 min, 4°C), um sämtliche Partikel, einschließlich der ungelösten Proteine, aus der Probe zu entfernen.

Ein mit einem Schreiber gekoppelter UV-Detektor registrierte die OD_{280} des Durchlaufs, sodass man am Ende der jeweiligen Absorbanzgifel unter Berücksichtigung der Flussrate leicht die entsprechenden Fraktionen zuordnen konnte. Von diesen Fraktionen wurden mit dem DU[®]-70 Spectrophotometer die Absorbanzspektren zwischen 260 und 320 nm gemessen. Nur die Fraktionen mit ausreichender Proteinkonzentration und guter spektraler Reinheit wurden vereinigt, durch Ultrafiltration über eine Amicon YM 10 Membran auf weniger als 1 ml eingeengt und danach erneut spektrophotometrisch vermessen. Unter Verwendung der mit dem Programm Expasy berechneten molaren Extinktionskoeffizienten [hpp CatH (kurz) $20910 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, hpp CatH (lang) $22400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ und hpp CatL $26600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$] wurde aus den OD_{280} Werten die Konzentration der Propeptidstammlösungen berechnet.

Diese Stammlösungen wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.3.4. Charakterisierung der rekombinanten Propeptide

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamidelektrophoresen erfolgten unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen (Lämmler et al., 1970).

Vorbereitung der Proben:

Tabelle 7: Zusammensetzung des Probenpuffers (6 x)

0,5 M TRIS; 0,4 % SDS; pH 6,8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
DTT	0,93 g
Bromphenolblau	12 mg
Gesamtvolumen	10 ml

Der mit einem Teil Probenpuffer (Tabelle 7) zu 5 Teilen Probenflüssigkeit vermischte Ansatz wurde 5 min lang bei 95°C inkubiert. Dieser Vorgang führte zur vollständigen Entfaltung der Proteine in der Probe. Nach Zentrifugation war die Probe bereit zum Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel.

Für einige Proben ergab sich durch die Anwesenheit von Guanidinhydrochlorid ein spezifisches Problem. Dieses Salz bildet mit SDS unlösliche Komplexe und stört so die elektrophoretische Trennung. Die Proben wurden deshalb durch die nachfolgend beschriebene Ethanolfällung von Guanidinhydrochlorid befreit (Coligan et al., 2003). Die zu reinigenden Proben wurden in Eppendorf-Hütchen 1:10 mit eiskaltem 100 %igem Ethanol für 5-10 min bei -80°C inkubiert und anschließend 5 min bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 250 µl eiskaltem 90 %igem Ethanol sorgfältig resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das gewaschene Sediment mit Probenpuffer, der zuvor 1:6 mit Wasser verdünnt worden war, wie oben beschrieben, durch Erhitzen solubilisiert. Das Volumen an Probenpuffer entsprach nicht dem anfänglich eingesetzten Probenvolumen. Es wurde unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration im Ausgangsmaterial so berechnet, dass sich bei der Füllung der Geltaschen mit 10 bis 15 µl Probe die zum sicheren Nachweis notwendige Proteinmenge darin befand.

Herstellen der Gele:

Tabelle 8: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Materialien	Sammelgel (5%)	Trenngel (15%)
40 % Acrylamid (29:1 Bisacrylamid)	0,75 ml	3,375 ml
1,5 M Tris/HCL, 0,4 % SDS, pH 8,8	---	2,25 ml
0,5 M Tris/HCL, 0,4 % SDS, pH 6,8	1,5 ml	---
Wasser (entionisiert)	3,75 ml	3,375 ml
APS (10 %)	25 µl	40 µl
TEMED	12,5 µl	20 µl

Die Pipettierpläne zur Herstellung der Lösungen für zwei Polyacrylamidgele sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Es ist zu beachten, dass APS und TEMED die Vernetzung des Acrylamids starteten und deshalb erst unmittelbar vor dem Einfüllen in die Gussform hinzugefügt werden durften.

Durchführung der Trennung:

Laufpuffer: 190 mM Glycin, 33 mM Tris, 0,1 % SDS

Die elektrophoretische Trennung erfolgte nach der Füllung der beiden Abteilungen der Trennkammer mit ca. 500 ml Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 200 V über 40 min.

Coomassie – Färbung der Polyacrylamidgele

Färbelösung: 1,5 g/l Coomassieblau G250, 50% Ethanol, 5 % Essigsäure

Entfärber: 50 % Methanol, 12,5 % Essigsäure

Die Polyacrylamidgele wurden 15 min bis 2 Stunden in der Färbelösung geschwenkt und danach mit mehrmaligen Austausch der Entfärbelösung im Verlauf von 4 bis 12 h schrittweise entfärbt.

Dokumentation der Ergebnisse und Aufbewahrung der Gele:

Geltrockenpuffer: 10 % Ethanol, 5 % Glycerol

Die gefärbten Polyacrylamidgele wurden in Geltrockenpuffer geschwenkt und anschließend mit Wasser gespült. Bevor die Gele zwischen zwei Zellophanschichten unter Vakuum bei 60°C 30 min getrocknet wurden, wurden sie zum großen Teil mit dem ImageMaster™ 1D digital fotografiert.

2.3.5. Massenspektrometrie durch MALDI-TOF

Die Matrix besteht aus: Zyano-4-Hydroxymizinsäure (Sinapinsäure) 10 mg/ml;
33%iges Acetonitril; 0,1 % Trifluoressigsäure

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Molekulargewichts- und Reinheitsprüfung führte ich unter Anleitung durch.

Durch Laserlicht im MALDI-Gerät verdampfte die Sinapinsäure-Matrix, in der die durch Trifluoressigsäure protonierten Peptidmoleküle eingebettet waren, sodass diese im Vakuum beschleunigt durch ein elektrisches Feld ohne Ablenkung direkt auf den Detektor prallten. Das Molekulargewicht wurde anhand der Zeit, die das Teilchen nach dem Laserschuss brauchte, um bis zur negativ geladene Detektorplatte zu fliegen, berechnet.

Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die zu untersuchenden Peptide nur in Azetonitril gelöst waren, also keine Fremdsalze in die Matrix eingeschleppt wurden. Deshalb führte ich unter Verwendung von ZipTip™ Pipettierspitzen exakt nach Vorschrift des Herstellers eine Konzentrierung und Entsalzung der Propeptide durch. Die Spitzen sind in der Lage ein Peptid oder ein kleines Protein von weniger als 40 kDa durch hydrophobe Wechselwirkungen zu binden. Es konnte durch Acetonitril wieder abgelöst werden. Die so gereinigten Propeptide und eine Lösung des als Eichprotein genutzten Cytochrom C wurden im Verhältnis 1:1 mit Sinapinsäure vermischt. Davon wurden anschließend sofort 2 µl auf die MALDI-Trägerplatte pipettiert und an der Luft getrocknet. Als Orientierung zum Auftrag der empfohlenen Proteinmenge von 5-10 pmol/Position diente die Regel, dass eine 10 µM Propeptidlösung für die Beladung der ZipTip™ Pipettierspitzen eingesetzt werden sollte.

2.4. Enzymkinetische Untersuchungen

2.4.1. Testdurchführung

Testpuffer 50 mM KH₂PO₄, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA,
0,01% Triton X-100; pH 6,5
2 mM DTT (frisch zusetzen)

Die Aktivität von vier Cathepsinen wurde in Abhängigkeit von der Substrat- und Propeptidkonzentration bei 37°C im o.g. Testpuffer kinetisch gemessen. Ich nutzte die in Tabelle 10 gelisteten synthetischen Substrate mit der fluorogenen Gruppe Aminomethylcoumarin (AMC). Gemessen wurde in gerührten 2 ml Küvetten am

Fluorometer LS 50 B bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm, bei 440 nm wurde das Emissionslicht gemessen. Da auch die Substrate eine gewisse Fluoreszenz aufwiesen, musste vor jeder Messserie die Empfindlichkeit des Gerätes durch Veränderung der Spaltbreiten so justiert werden, dass die Ausgangsfluoreszenz bei weniger als 2/3, meist unter 1/3 des Maximalausschlages lag. So war ein ausreichend langer Zeitraum zur Beobachtung des Anstiegs der Produktfluoreszenz gesichert.

Bei der praktischen Durchführung wurde ebenfalls berücksichtigt, dass die Wärmeübertragung vom Küvettenhalter zur Flüssigkeit in der Küvette trotz des Rührens nur sehr langsam erfolgt. Deshalb wurde die Temperatureinstellung dadurch beschleunigt, dass die mit dem Testgemisch, d.h. Testpuffer, Substrat und evtl. Propeptid, gefüllte Küvette 1 Minute im Wasserbad bei 37°C vortemperiert wurde. Der Reaktionsstart erfolgte grundsätzlich durch die Enzymzugabe, zeitgleich musste die Registrierung gestartet werden. Die Enzymkonzentration war bei einer Serie von Messungen in Variation von Substrat- oder Inhibitorkonzentrationen konstant und lag im Bereich zwischen 10 und 100 pM. Sie wurden jeweils so gewählt, dass auch bei der höchsten Enzymaktivität vom Start bis zum Erreichen des Maximalausschlages des Gerätes etwa 1 min Beobachtungszeit verblieb, in der circa 100 Messpunkte zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit registriert wurden. Aus diesen Messpunkten wurde durch nichtlineare Regression nach Gleichung 1 die Anfangsgeschwindigkeit berechnet.

$$P = v_z \cdot t \cdot e^{-b \cdot t} + P_0$$

Gleichung 1

Die Bedeutung der Symbole lautet wie folgt: P entspricht der Produktkonzentration, P_0 der Produktkonzentration zum Zeitpunkt Null, v_z ist die gesuchte Anfangsgeschwindigkeit und t die Zeit. Der Term $e^{-b \cdot t}$ berücksichtigt den Geschwindigkeitsverlust, der durch Substratverbrauch oder Enzymaktivitätsverlust zustande kommt, dabei entspricht b dem Geschwindigkeitsabfall während der Messzeit. Die Substratkonzentration im Test richtete sich nach dem jeweiligen K_M -Wert, beide Angaben befinden sich im Abschnitt der Ergebnisse in Tab. 10.

2.4.2. Bestimmung des K_M -Wertes

Die Kenntnis der K_M -Werte unter den gegebenen Versuchsbedingungen war aus zwei Gründen notwendig. Einmal zur Ermittlung der in den Test einzusetzenden Substratkonzentrationen ($[S] > K_M$), um den Einfluss der unvermeidlichen Verminderung der Substratkonzentration während der Beobachtungszeit auf das Messergebnis so gering wie möglich zu halten. Zum anderen war seine Kenntnis zur Berechnung der Inhibitionskonstanten K_i und k_{off} notwendig. Durch eine sorgfältige Versuchsplanung bei der K_M -Bestimmung sollten zwei mögliche Fehlerquellen minimiert werden: einerseits die unvermeidlichen Pipettierfehler, welche prozentual um so größer werden, je kleiner das pipettierte Volumen wurde, und andererseits die Konzentrationsverluste beim Hantieren mit Substratlösungen durch Bindung an Kunststoffoberflächen.

Solche Bindungen waren bei hydrophoben Molekülen, wie sie die verwendeten fluorogenen Peptidsubstrate darstellen, zu erwarten und bereits in der Literatur erwähnt worden (Kleint, 2004). Um den Volumenfehler beim Pipettieren zu vermindern, wurden zwei Stammlösungen (in Glasgefäßen) hergestellt, eine mit der höchsten geplanten Substratkonzentration, die andere ohne Substrat. Durch Mischung vergleichsweise großer Volumina (zwischen 100 und 2000 μl) direkt in der Glasküvette wurde die jeweils gewünschte Substratkonzentration eingestellt. Alle Pipettenspitzen, die zum Abmessen substrathaltiger Lösungen verwendet werden sollten, wurden anfangs mehrfach mit der entsprechenden Lösung gespült, um alle Bindungsstellen des Kunststoffs zu besetzen. Jede dieser präparierten Spitzen wurde danach immer wieder benutzt.

Durch nichtlineare Regression konnten aus 10 bis 12 Einzelmessungen V_{max} sowie K_M unter Verwendung des Michaelis-Menten-Modells errechnet werden (Gleichung 2).

$$V_z = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$V_z = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]} + \frac{K_M \cdot [S]}{K_i}} \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Symbole haben folgende Bedeutung: V_z ist die aus den gemessenen Produktbildungs- Zeit- Kurven unter Verwendung von Gleichung 1 berechnete Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, V_{max} die Maximalgeschwindigkeit, $[S]$ die Substratkonzentration, K_M die gesuchte Michaelis-Menten-Konstante und K_i die Inhibitionskonstante im Fall einer Hemmwirkung des Substrats (Gleichung 3).

2.4.3. Bestimmung der Inhibitionskonstanten K_i und k_{off}

Art und Stärke der Bindung zwischen Enzym und Inhibitor konnten aus dem Zeitverlauf der Produktbildung zwischen Start der Reaktion durch die Enzymzugabe und der Gleichgewichtseinstellung zwischen Enzym, Substrat und Inhibitor nach (mathematisch betrachtet) unendlich langer Beobachtungszeit ermittelt werden, der meist nicht linear war. Die geprüften Propeptidkonzentrationen ergaben sich aus der jeweiligen Wirksamkeit. Deshalb wurde bei jedem Enzym zuerst die minimale Inhibitorkonzentration bestimmt, die zu einer weitestgehenden Hemmung des Substratumsatzes führten. Jede Messreihe wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen mit 12 bis 15 unterschiedlichen Propeptidkonzentrationen zwischen Null und diesem Grenzwert durchgeführt. Die jeweils gewünschte Inhibitorkonzentration wurde durch genaue Mischung zweier Stammlösungen eingestellt, ähnlich der Bestimmung der K_M -Werte für die Substratkonzentration.

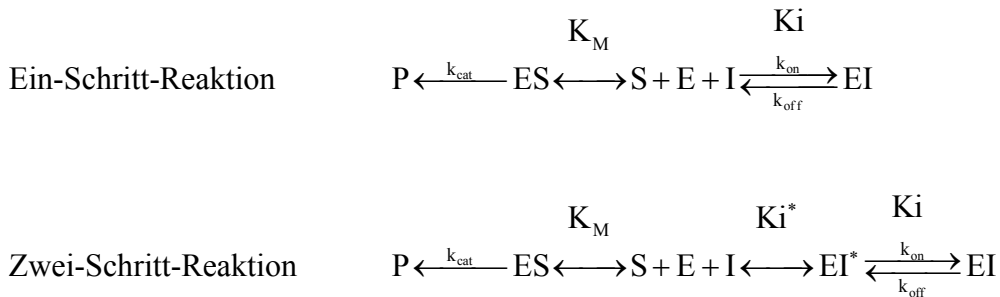
Eine zeitabhängige Verstärkung der inhibitorischen Wirkung, die zu der beobachteten Nichtlinearität der Produkt-Zeit-Kurven führt, war typisch für die Hemmung von Enzymen durch Propeptid-Inhibitoren. Die Auswertung musste deshalb durch nichtlineare Regressionsberechnung unter Verwendung von Gleichung 4 erfolgen. So erhielt ich die Anfangsgeschwindigkeit (V_z), die Geschwindigkeit nach Gleichgewichtseinstellung (V_s) und die sogenannten Geschwindigkeitskonstante pseudo 1. Ordnung (λ) für die Bildung des Enzym- Inhibitor- Komplexes (k_{on}).

$$P = V_s \cdot t + (V_z - V_s) \cdot \frac{(1 - e^{-\lambda \cdot t})}{\lambda} + P_o \quad \text{Gleichung 4}$$

Wenn man die mit Gleichung 4 berechneten Größen als Funktion der eingesetzte Propeptidkonzentration ($[I]$) darstellt, kann man aus der Form der Kurven für $V_z = f([I])$

und $\lambda=f([I])$ erkennen, welcher der in Schema 2 gezeigten Reaktionsmechanismen für die langsame Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes verantwortlich war.

Schema 2: Mechanismen der Propeptid-Inhibition der Cathepsine H, K, L und S



Legende:

E Enzym, I Inhibitor, P Produkt, S Substrat, k_{cat} katalytische Konstante für die Produktbildung, EI, EI* unterschiedlich stabile Enzym-Inhibitor-Komplexe, ES Enzym-Substrat-Komplex, K_i , K_i^* Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor-Komplexe k_{on} , k_{off} Geschwindigkeitskonstante für Bildung bzw. Zerfall des Enzym-Inhibitor-Komplexes

In beiden Fällen erfolgte die Bildung des endgültigen Enzym-Inhibitor-Komplexes langsam. Die Dissoziationskonstante K_i ist ein Maß für seine Stabilität und wurde nach Gleichung 5 (Tabelle 9) aus $v_s=f([I])$ berechnet. Die Konstante K_i^* beschreibt die erste Teilreaktion der Zwei-Schritt-Reaktion, in der sich Enzym und Inhibitor rasch locker miteinander verbanden. Erst im zweiten Teilabschnitt kam es langsam zur Ausbildung eines stabilen Komplexes. Die Berechnung von K_i^* erfolgte aus $v_z=f([I])$ nach Gleichung 6 (Tabelle 9).

Beim Vergleich der Stabilität von Komplexen, die in einer Ein- oder Zwei-Schritt-Reaktion entstanden waren, war die Kenntnis der jeweiligen Zerfallskonstanten k_{off} erforderlich, welche aus $\lambda=f(I)$ bestimmt werden konnten. Bei der Ein-Schritt-Reaktion war $\lambda=f([I])$ eine Gerade, bei der Zwei-Schritt-Reaktion eine Hyperbel (Gleichungen 7 bzw. 8 in Tabelle 9) ersichtlich.

Tabelle 9: Übersicht über die Gleichungen zur Berechnung der kinetischen Konstanten von langsamen Enzym-Inhibitor-Reaktionen.

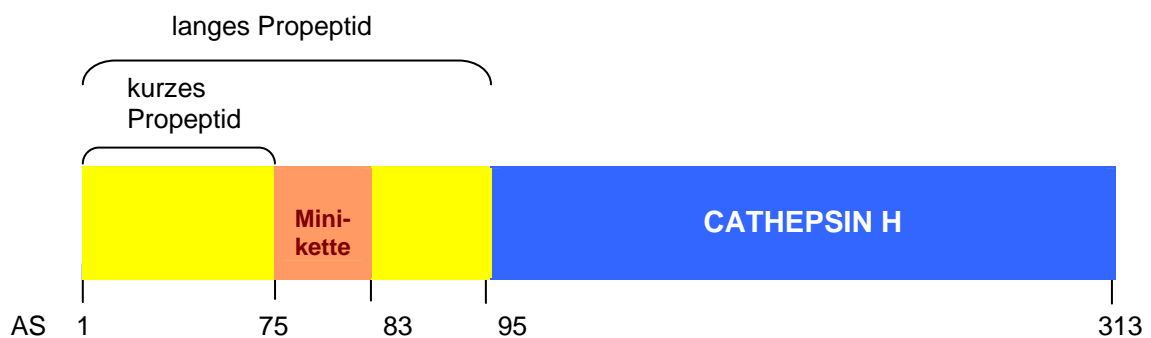
Zu bestimmender Parameter	Reaktionsmechanismen	
	Ein-Schritt-Reaktion	Zwei-Schritt-Reaktion
K_i	$V_s = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_i}} \quad (\text{Gleichung 5})$	
K_i^*	$V_z = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_i^*}} \quad (\text{Gl. 6})$	
K_{off}	$\lambda = k_{\text{off}} \frac{k_{\text{on}} [I]}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (\text{Gl.7})$	$\lambda = k_{\text{off}} \frac{1 + \frac{[I]}{K_i(1 + \frac{[S]}{K_M})}}{1 + \frac{[I]}{K_i^*(1 + \frac{[S]}{K_M})}} \quad (\text{Gl.8})$

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung der Propeptide von Cathepsin H (kurz), Cathpesin H (lang) und Cathepsin L

Die Primärstrukturen der Prä-Proformen von Cathepsin H und L sind bekannt und in der Swiss-Prot/Trembl Datenbank abgelegt. Dort sind auch die einzelnen Funktionsabschnitte definiert. Für humanes Cathepsin L ist das Propeptid 96 AS lang und umfasst die Aminosäuren Thr 18 – Glu 113, für humanes Cathepsin H ist nur ein 75 AS langes Propeptid ausgewiesen (Ala 1 – Ser 75). Hier bleiben nach Aktivierung durch limitierte Proteolyse acht AS der Prosequenz als sogenannte Minikette (Glu 76- Thr 83) im aktivem Zentrum zurück und beeinflussen die katalytischen Eigenschaften diese Enzyms so, dass es als Amino-Peptidase wirkt (Koga et al., 1992; Takahashi et al., 1988). Seine Verwandten aus der Cathepsin-L-ähnlichen Unterfamilie verlieren bei der Aktivierung die gesamte Prosequenz. Durch einen Strukturvergleich lässt sich auch beim Cathepsin H ein 95 AS langer Funktionsabschnitt definieren (Ala 1 – Pro 95), der den Propeptiden der verwandten Enzyme entspricht.

Für den geplanten Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit der Propeptide aus der Cathepsin L-ähnlichen Unterfamilie schien es deshalb sinnvoll, beide Propeptidvarianten des Cathepsin H zu untersuchen. Sie werden nachfolgend als kurz (Ala 1 – Ser 75) und lang (Ala 1 –Pro 95) bezeichnet (Schema 3).



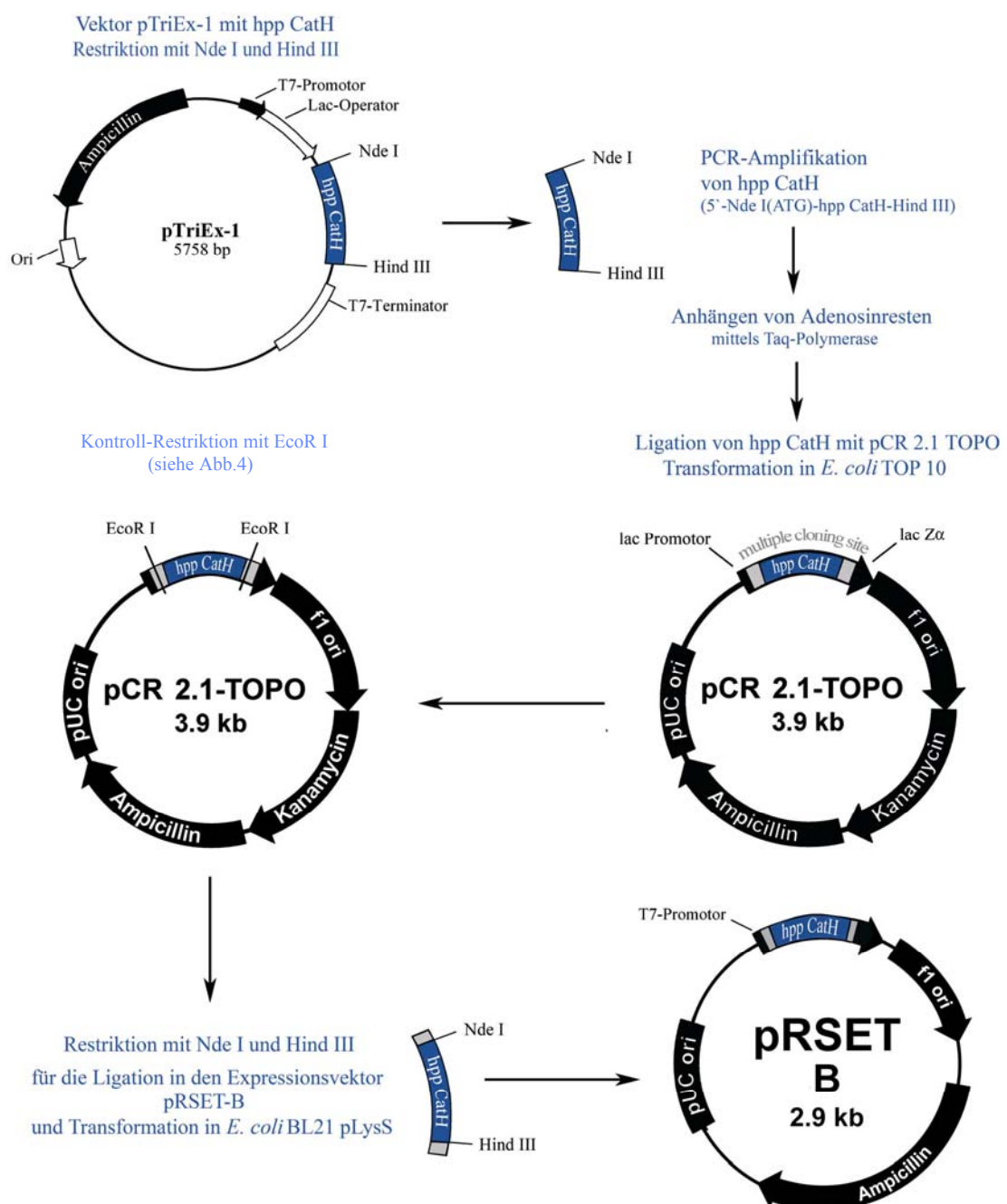
Schema 3: Darstellung der Funktionsabschnitte von Procathepsin H

Es sind die jeweiligen Abschnitte, die das kurze (Ala 1 – Ser 75) und das lange Propeptid (Ala 1 – Ser 95) von Cathepsin H innerhalb der Proregion einnehmen, abgebildet.

3.1.1. Herstellung des Expressionsvektors

Bevor man die Propeptide von Cathepsin H und Cathepsin L in *E. coli* exprimieren konnte, bedurfte es einiger vorbereitender Maßnahmen, um die DNA-Sequenzen in den Expressionsvektor pRSET-B einfügen zu können. Der Ablauf, sowie die Vorgehensweise sind im Schema 4 beispielhaft für das Propeptid von Cathepsin H verdeutlicht.

Schema 4: Herstellung der Konstrukte und Zwischenschritte



Im ersten Schritt wurde der Propeptid codierende DNA-Abschnitt mittels PCR vervielfältigt, wobei gleichzeitig durch die Wahl entsprechender Primersequenzen die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Nde I und Hind III eingefügt wurden (siehe Methodenteil 2.2.1).

Die Größe der PCR-Produkte wurde anhand einer Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert, Abbildung 3 zeigt dazu zwei Beispiele.

In diesen beiden Fällen und auch beim nicht gezeigten hpp CatH (lang) stimmt die Größe der Hauptbande mit dem aus der Datenbank ermittelten Wert überein.

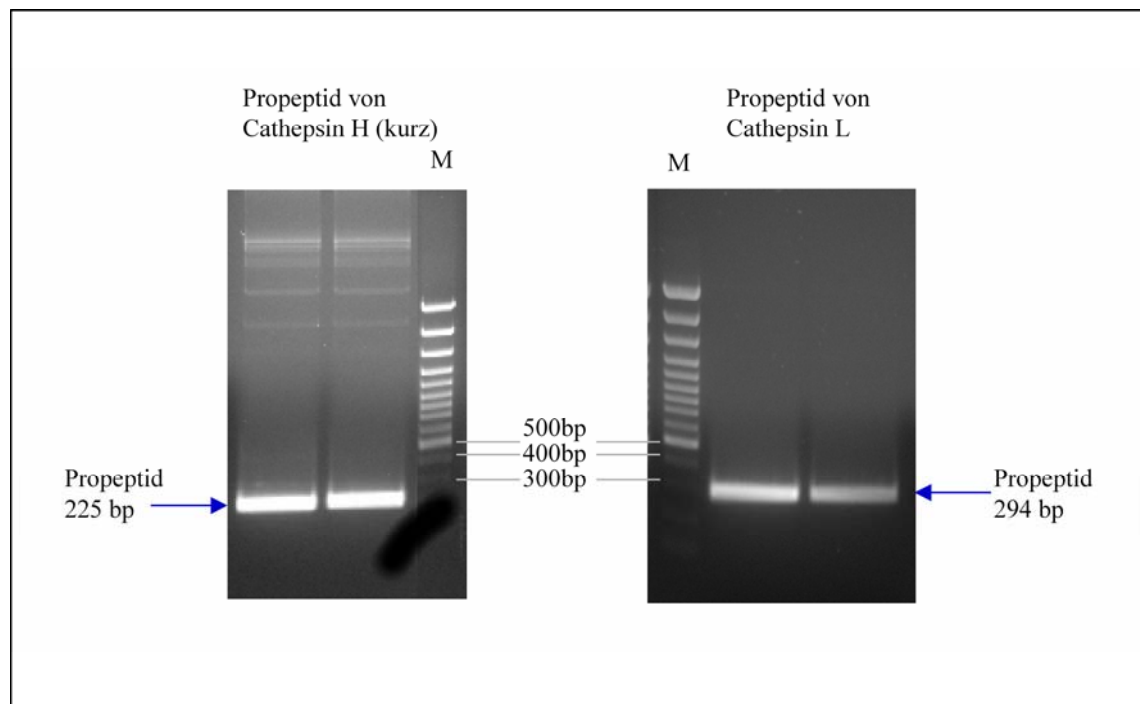


Abb. 3: Charakterisierung der PCR-Produkte nach Amplifizierung der Propeptid-Sequenzen

Der gesamte PCR-Ansatz (75 μ l für hpp CatL bzw. 100 μ l für hpp CatH) wurde mit Probenpuffer versetzt und in einem ethidiumbromidhaltigem 1%igem Agarosegel als Doppelbestimmung elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Methodik 2.3.2). Als Standard diente der 100bp DNA-Molekulargewichtsstandard (M).

Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel nach Vorschrift extrahiert, wie in Abschnitt 2.2.2 der Methodik beschrieben. Es erfolgte die Ligation von hpp CatH mit dem Vektor pCR 2.1 TOPO. Zur Kontrolle der einwandfreien Transformation des Propeptids in *E.coli* Top 10 wurde der Vektor mit EcoRI verdaut und im Agarosegel aufgetrennt (Abb.4).

Auf den Elektrophoresebahnen 1 bis 4 sind im Bereich von ca. 225 bp, entsprechend der Größe des Propeptides vom Cathepsin H, eindeutige Banden zu erkennen. Bei dem Restriktionsansatz auf Bahn 5 ist keine vollständige Restriktion erfolgt, sodass dieser Klon nicht weiter verwendet werden konnte. Alle anderen Klone wurden einer

Sequenzierung zur Überprüfung auf korrekte Amplifizierung unterzogen. Sie bestätigte die genaue Übereinstimmung der AS-Sequenz jedes Klonen mit der des Propeptides vom Cathepsin H. Die AS-Sequenz stammte aus der Datenbank (<http://au.expasy.org/cgi-bin/protparam1>).

Die mit dem Programm DNA Star ermittelten AS-Sequenzen stimmten bei jedem Klon mit der Datenbankangabe überein, sodass sich die Umklonierung in den Expressionsvektor pRSET-B, wie in Methodik 2.2.3. beschrieben, anschließen konnte.

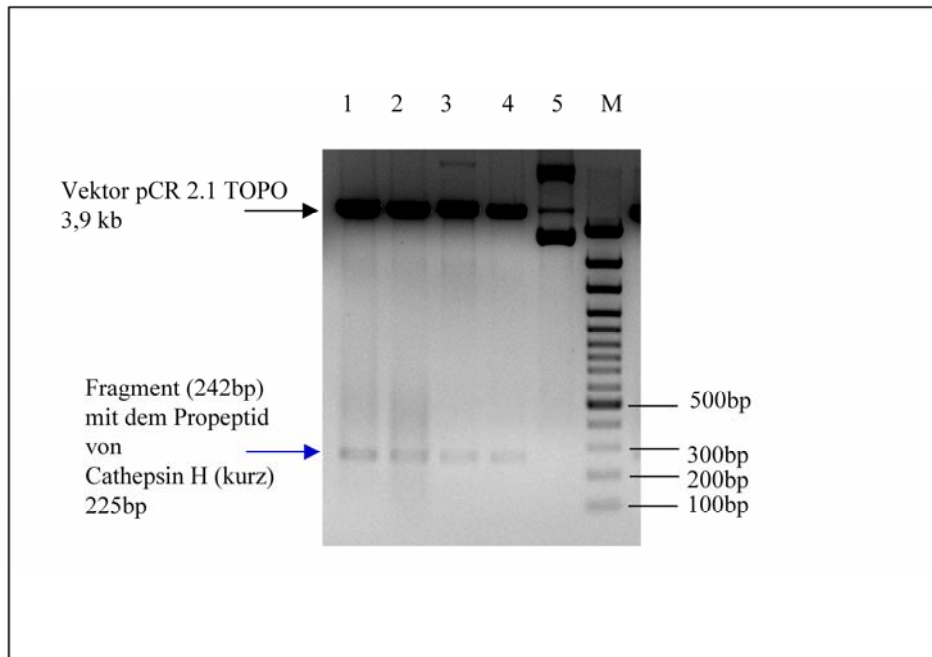


Abb. 4: Restriktionsverdau von pCR 2.1 TOPO hppCatH

Die in *E. coli* TOP 10 vermehrten Plasmide wurden mit EcoR1 verdaut und in einem 1,2%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Die Zahlen 1 bis 5 stehen für verschiedene weiße Klone, M für den 100bp Molekulargewichtsstandard. Nach Aufarbeitung (siehe Methodik 2.2.3) wurden jeweils 3 µl der Plasmid-DNA für den Gelauftrag verwendet. Die Pfeile verweisen auf den Vektor pCR 2.1 TOPO und auf das Fragment von hpp CatH mit der erwarteten Größe von 225bp.

Danach wurde der DNA-Abschnitt mit Nde I und Hind III geschnitten und in den Expressionsvektor pRSET-B einkloniert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* BL21 pLysS.

3.1.2. Bakterielle Expression der Propeptide

Zur Expression von hpp CatH und hpp CatL verwendete ich den Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS, ein T7 RNA-Polymerase regulierter Stamm und den Expressionsvektor pRSET-B.

Die transformierten Bakterien wurden wie unter 2.2.3. bzw. 2.3.1. in der Methodik beschrieben, verarbeitet. Die Propeptide von Cathepsin H und L wurden elektrophoretisch untersucht. Einige dieser Proteingele sind in Abb. 5 dargestellt.

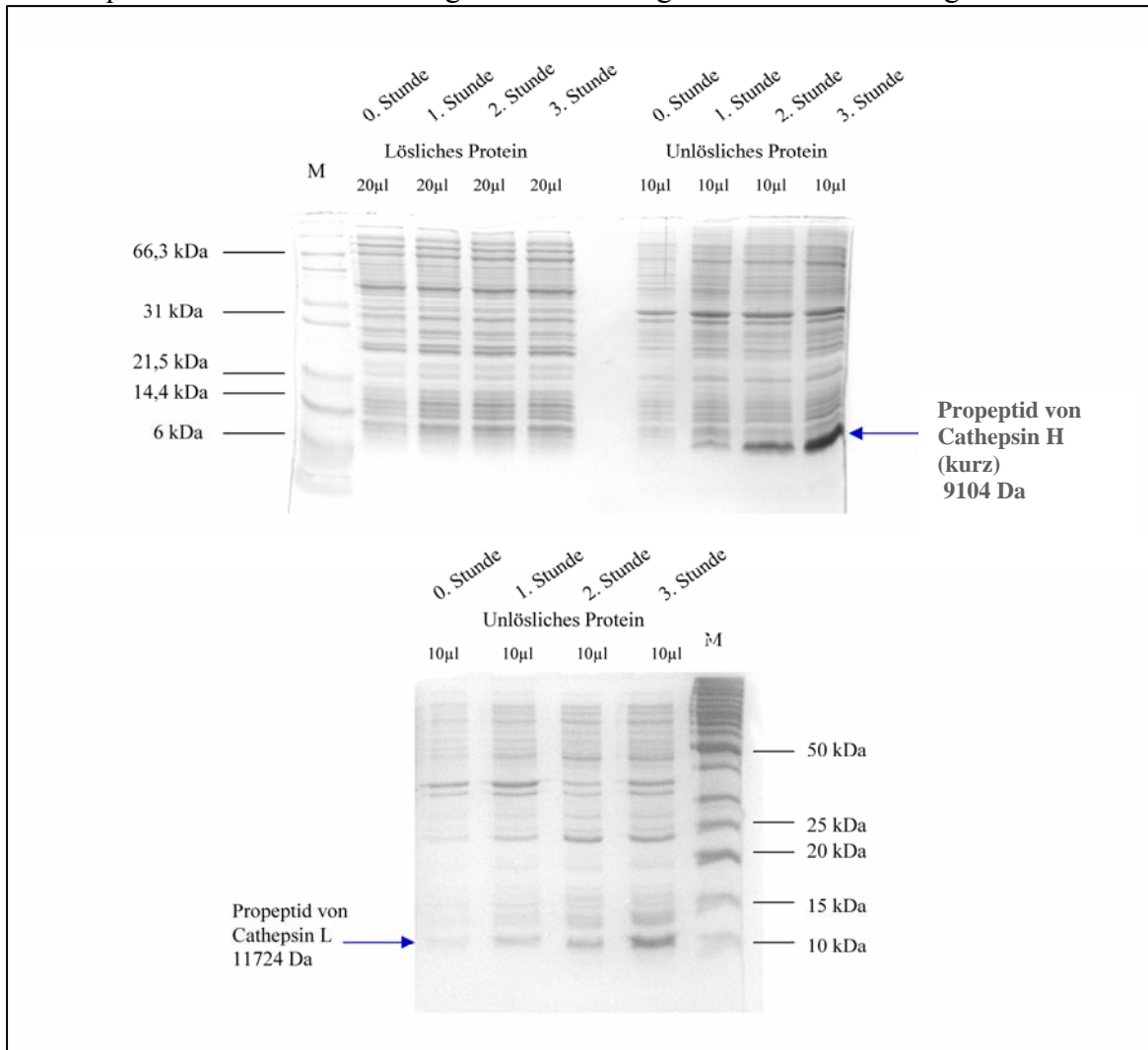


Abb. 5: Darstellung der unlöslichen Bestandteile nach Probeexpression von hpp CatH (kurz) und hpp CatL in *E.coli* Bl21(DE3)pLysS

1 ml Bakteriensuspension wurde mittels Zentrifugation pelletiert. Nach der Aufarbeitung (siehe 2.3.1 im Methodenteil) der Proben wurde der Überstand mit 100 µl 2 x Probenpuffer (PP) und das Pellet mit 100 µl 1 x PP versehen. Nach Denaturierung (95°C, 5 min) wurden die Proben aufgetragen und elektrophoretisch im 12,5 %igen (hpp CatH) und im 15 %igen (für hpp CatL) SDS-PAGE getrennt. Als Molekulargewichtsstandard (M) wurde der Mark12™ Wide Range Protein Standard verwendet.

Man erkennt, dass jeweils eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht der Propeptide nach der Induktion im Verlauf von 3 Stunden im unlöslichen Anteil zunimmt. Das war der Beweis für die erfolgreiche Expression der gewünschten Propeptide. Da im Zytoplasma keine rekombinanten Propeptide nachgewiesen werden konnten, kann man schlussfolgern, dass auch hpp CatL und hpp CatH in den Bakterienzellen in präzipitierter Form, in sogenannten Einschlusskörperchen vorliegen, wie das in der Vergangenheit schon bei hpp CatS und hpp CatK beobachtet wurde.

Die präparative Expression wurde anschließend unter genau den gleichen Bedingungen durchgeführt. Auch diese Expressionen wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die Ergebnisse waren mit denen in Abb. 5 gezeigten vergleichbar und sind deshalb nicht nochmals dargestellt.

3.1.3. Reinigung und Charakterisierung der Propeptide von Cathepsin H und L

Die Gewinnung der rekombinanten Propeptide erfolgte wie im Methodenteil unter 2.3.2 beschrieben. Diese Prozedur basiert auf Empfehlungen in einschlägigen Handbüchern und Erfahrungen in der eigenen Arbeitsgruppe bei der bakteriellen Herstellung anderer Proteine.

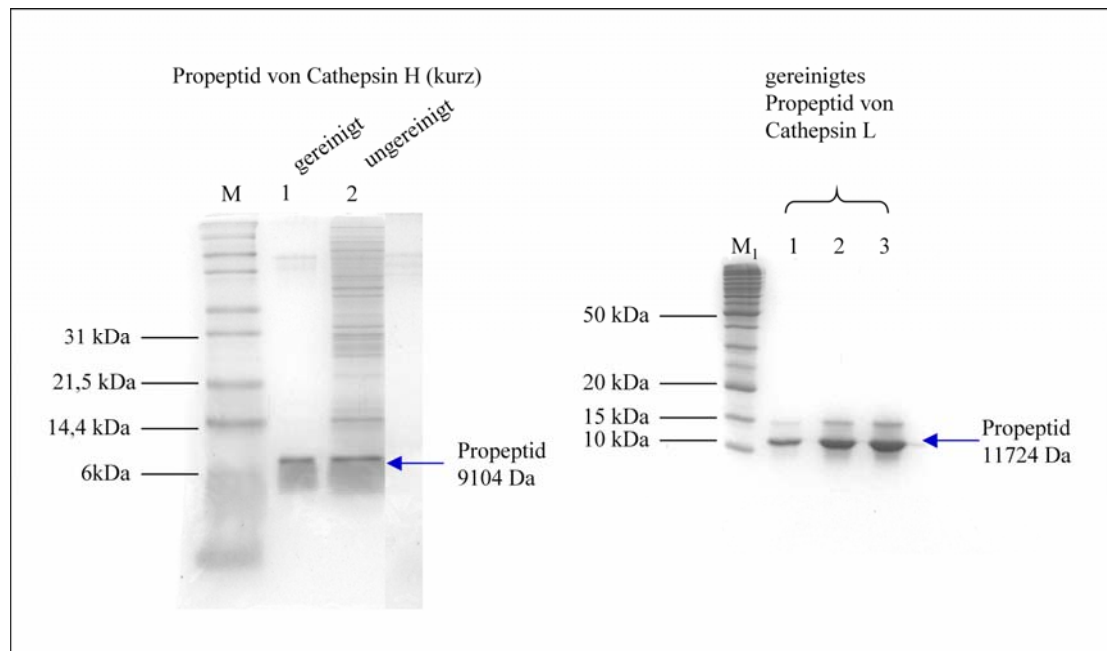


Abb. 6: Kontrolle der Reinigung des Propeptids vom Cathepsin H (kurz) und vom Cathepsin L

In einem jeweils 15 %igem SDS-Gel wurden in Bahn 1: 3,6 µg hpp CatH und 5 µl 2 x Probenpuffer (PP) und in Bahn 2: ca. 3 µg hpp CatH und 5 µl PP aufgetragen. Bei hpp CatL wurden unterschiedliche Mengen des Propeptides mit der Stammlösungskonzentration von 53 µM aufgetragen: Bahn 1: 1,55 µg hpp CatL und 7,5 µl 2 x PP, Bahn 2: 3,1 µg hpp CatL und 5 µl 2 x PP und Bahn 3: 6,21 µg ohne Zusatz von PP aufgetragen. Die Proben wurden durch Ethanol-fällung vom Guanidinhydrochlorid befreit, um Präzipitate mit SDS zu vermeiden (siehe Methodenteil 2.3.4.). Als Molekulargewichtsstandards wurden Mark12™ Wide Range Protein Standard (M) und Bench Mark™ Protein Ladder (M₁) verwendet.

Für den Nachweis der erfolgreichen Reinigung wurde vor und nach der Reinigung eine Probe des Propeptids vom Cathepsin H und vom Cathepsin L elektrophoretisch (Abb. 6) untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Mengen der Stammlösung vom hpp CatH (kurz) und hpp CatL verwendet. Beim Cathepsin H (kurz) waren sowohl beim

gereinigten als auch beim ungereinigten Propeptid eindeutig Banden im Bereich von ca. 9 kDa zu erkennen, wobei der darunter befindliche Schleier vermutlich auf Störungen seitens des Gels zurückzuführen war. Im Gel des Cathepsin L erschienen 2 Banden, wobei die Schwächere bei ca. 15 kDa und die deutlich Stärkere, die einen Volumenanteil von mehr als 90 % einnahm, bei ca. 11 kDa auftrat. Die Elektrophoresen bestätigten die jeweiligen Molekulargewichte der Cathepsine: hpp CatH 9104 Dalton und hpp CatL 11724 Dalton. Eine Untersuchung des langen Propeptides vom Cathepsin H mit einem Molekulargewicht von 11009 Dalton ist ebenfalls erfolgt, jedoch nicht dargestellt.

Um weitere Aussagen über die Propeptide hinsichtlich ihrer Identität und ihrer Reinheit treffen zu können, verwendete ich die Massenspektrometrie als zusätzliche Untersuchungsmethode. Sie liefert genaue Angaben zum Molekulargewicht und Zusatzinformationen zur Reinheit der Präparate. Vorbereitung und Durchführung sind im Abschnitt 2.3.5 des Methodenteils genau beschrieben.

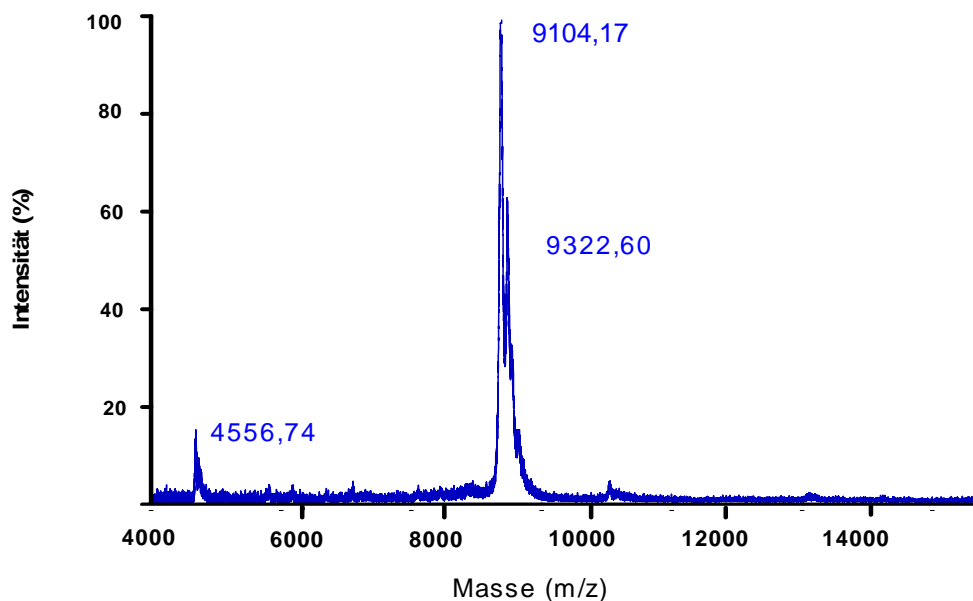


Abb. 7: Massenspektrometrie des gereinigten Propeptids vom Cathepsin H

Zur Konzentrierung und Entfernung von Fremdsalzen wurde die Probe mittels ZipTip™ Pipettierspitzen gereinigt. Durch Zugabe von Acetonitril konnte die Probe aus den Papierspitzen entfernt und anschließend 1:1 in Sinapinsäure gelöst werden.

In Abbildung 7 ist das Ergebnis einer MALDI-TOF Untersuchung beispielhaft von hpp CatH (kurz) im Diagramm dargestellt. Derartige Untersuchungen sind für das lange Propeptid von Cathepsin H und für das Propetiptid von Cathepsin L erfolgreich durchgeführt, jedoch nicht dargestellt worden. Der höchste Gipfel stellt mit 9104,17 Da das einfach protonierte Propeptid (MG = 9104 Da) dar. Die geringe Differenz ergab

sich aus der Fehlerabweichung seitens des Gerätes, welche sich aber durchaus noch im akzeptablen Rahmen befand.

Der linke Gipfel (4556,74 Da) kann der doppelt protonierten Form zugeordnet werden.

3.2. Enzymkinetische Messungen

3.2.1. Voruntersuchungen

Die Wechselwirkungen zwischen den drei von mir hergestellten Propeptiden und den humanen Cathepsinen H, K, L und S sollte durch die Messung der Hemmwirkung der Propeptide auf die Enzymaktivität analysiert werden. Ein einfaches und gleichzeitig empfindliches Verfahren zur Messung der Aktivität von Proteasen war die fluorometrische Messung der Spaltung von AMC-gekoppelten Peptiden. Die hohe Empfindlichkeit hatte den Vorteil, dass nur vergleichsweise geringe Mengen an Enzym für die Messungen benötigt wurden, trotz der Verwendung von 2 ml Küvetten. Eine solche Voruntersuchung ist in Abb. 8 beispielhaft für Cathepsin H (kurz) dargestellt. In diesem Fall wurde die ausschließende Messreihe mit 10 μM Substrat und einer Spaltbreite von 3,5 nm durchgeführt

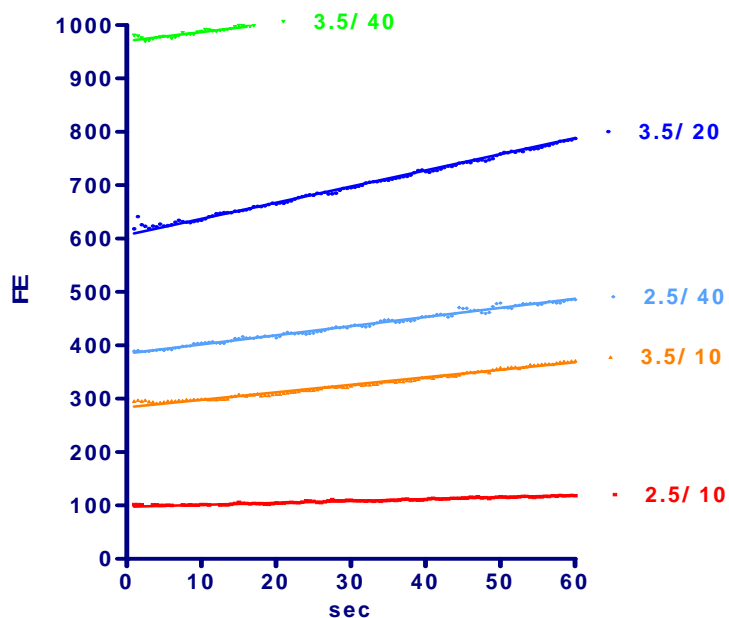


Abb. 8: Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals bei der Messung der Cathepsin H Aktivität von der Spalteinstellung und von der Substratkonzentration

Die Messungen wurden bei 37°C im Fluorometer LS50B im Standardtestmedium durchgeführt. In allen Tests war die gleiche Enzymkonzentration verwendet worden. An den Kurven sind die Spaltbreiten (2,5 und 3,5 nm) und die Substratkonzentrationen (H-Arg-AMC; 10, 20 und 40 μM) angegeben.

Alle bisher untersuchten Propeptide der Papainfamilie erwiesen sich als kompetitive Inhibitoren des Mutterenzym und nahe verwandter Familienmitglieder.

Für zwei Enzym-Substrat-Paare konnte ich auf Literaturdaten zurückgreifen, zwei K_M -Werte habe ich selbst bestimmt. Alle Werte sind in Tabelle 10 zusammen mit den daraus abgeleiteten Substratkonzentrationen zusammengestellt.

Tabelle 10: Die für die Aktivitätsmessung der Cathepsine H, K, L, S benutzten Substrate und deren K_M -Werte

Cathepsin	Substrat	K_M -Wert (μM)	[Substrat] im Test (μM)
H	H-Arg-AMC	$27,3 \pm 3,6_a$	10-30
L	Z-Phe-Arg-AMC	$3,2 \pm 0,1_a$	5-6
K	Z-Leu-Arg-AMC	$5,7 \pm 1,2_b$	6-10
S	Z-Val-Val-Arg-AMC	$18,4 \pm 0,8_c$	10-20

^a eigene Experimente

^b R. Kleint, 2004. Analyse von Cathepsin K-Ligand-Wechselwirkungen: Vorarbeiten zur Untersuchung der Propeptid-katalysierten Faltung dieses Enzyms [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

^c G. Kramer, 2004. [Dissertation] Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Beispielhaft möchte ich die Bestimmung des K_M -Wertes für die Reaktion von Cathepsin H mit H-Arg-AMC beschreiben, für die es nur widersprüchliche Literaturdaten gibt (K_M -Wert von 0,1 nM; Tchoupé et al., 1991; K_M -Wert von 50 μM bei Dodt und Reichwein, 2003). Es wurden drei Versuchsreihen (A, B und C; Abb. 12) mit jeweils 10 bis 12 unterschiedlichen Substratkonzentrationen von 0-200 μM durchgeführt.

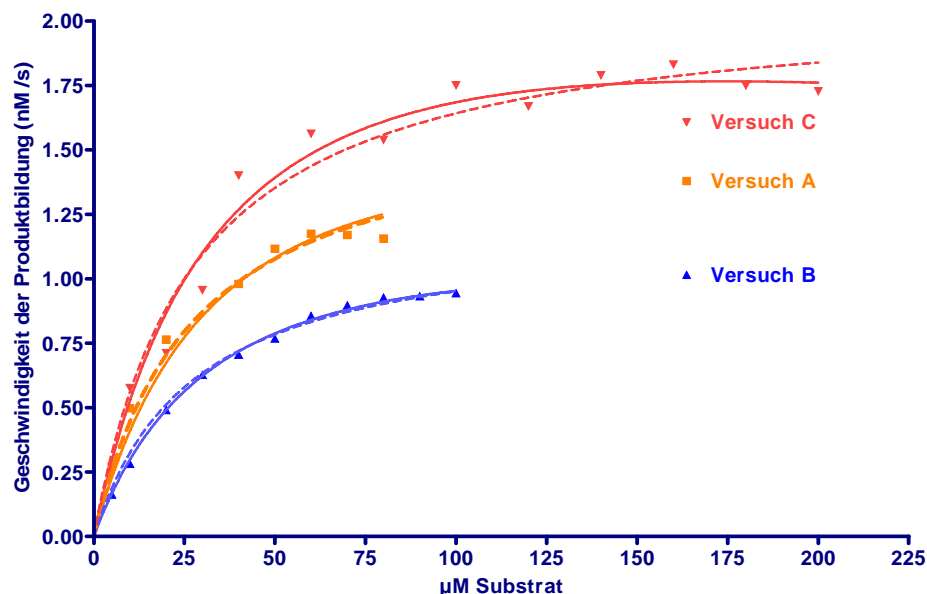


Abb. 9: K_M -Wert-Bestimmung für den Umsatz von H-Arg-AMC durch Cathepsin H

Die Messungen wurden unter Standardbedingungen (vergl. Methodik) durchgeführt. Dargestellt sind die Anfangsgeschwindigkeiten der Produktbildungs-Zeit-Kurven in Abhängigkeit von der Substratkonzentration im Test. Die gestrichelt eingezeichneten Kurven entsprechen dem einfachen Michaelis-Menten-Modell (Gl. 2), die voll gezeichneten berücksichtigen eine Substrathemmung (Gl. 3).

Die Auswertung erfolgte zuerst mit dem einfachen Michaelis Menten Modell (Methodik 2.4.2) und ergab einen K_M von $27.3 \pm 3.6 \mu\text{M}$. Der Verlauf der mit der Michaelis Menten Gleichung berechneten Kurven entsprach einer Hyperbel. Bei genauerer Betrachtung des Versuches C fiel auf, dass es im mittleren Segment und auch im Endabschnitt erhebliche Differenzen zwischen Kurvenverlauf und Messpunkten gab. Da es in der Literatur Hinweise auf eine Hemmung von Cathepsinen durch Peptidsubstrate gab (Kleint, 2004) und für eine Mutante von Cathepsin H schon entsprechende Daten bekannt waren (Vasiljeva et al., 2003), haben wir alle Kurven auf eine mögliche Substrathemmung untersucht. Das für alle derartigen Optimierungsrechnungen benutzte Programm PRISM ermöglichte auch Modellvergleiche. Dabei ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 75% für das Vorliegen einer Substrathemmung, der K_M -Wert läge in diesem Fall bei $37.8 \pm 6.7 \mu\text{M}$. Da die Substrathemmung vergleichsweise gering war ($K_i = 30 \pm 12 \text{ mM}$), wurde bei den folgenden Inhibitionsstudien mit den Propeptiden die Substratkonzentration so gewählt, dass der inhibitorische Nebeneffekt zu vernachlässigen war.

3.2.2. Inhibitionswirkung der Propeptide von Cathepsin H und von Cathepsin L gegenüber den Cathepsinen H, K, L und S

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, sind Wechselwirkungen zwischen der Proregion und dem reifen Enzym Voraussetzung sowohl für die Inhibition als auch für die Faltungskatalyse. Durch die Beobachtung von Bildungs- und Zerfallskinetik des Komplexes von Enzym und Propeptid konnte man die Art und Stärke dieser Wechselwirkungen quantifizieren und auf dieser Grundlage Vergleiche zwischen verschiedenen Enzym-Propeptid-Kombinationen anstellen. Solche Vergleiche ermöglichten dann Aussagen zur Selektivität der Wechselwirkungen, wie das in der Zielstellung dieser Arbeit formuliert wurde.


Der Vergleich von kinetischen Konstanten war aber nur dann problemlos möglich, wenn die zugrunde liegenden experimentellen Daten unter vergleichbaren Bedingungen ermittelt wurden. Besondere Bedeutung hatte in diesem Zusammenhang der pH-Wert, denn die Interaktion zwischen Enzym und Propeptid wird im sauren Milieu schwächer. Andererseits waren viele Cathepsine bei neutralem pH-Wert instabil. Ein guter Kompromiss war die Festlegung eines pH von 6,5 in allen Versuchsreihen. Alle übrigen Testbedingungen, mit Ausnahme des Substrates, waren ebenfalls identisch. Die Einzel-


heiten sind in der Methodik (2.4.1.) und in Tabelle 10 zusammengestellt. Auch der Ablauf der Inhibitionsversuche war in allen Fällen gleich, Substrat und Inhibitor befanden sich schon im vortemperierten Testmedium. Mit einem sehr kleinen Volumen Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet. Der Anstieg der Produktfluoreszenz wurde kontinuierlich beobachtet. Aus mindestens zehn Produktbildungs-Zeit-Kurven in Gegenwart definierter Propeptidkonzentrationen wurden K_i -Werte ermittelt, falls möglich auch k_{off} -Werte. In den meisten Fällen gab es mehrere solcher Messreihen, die immer individuell und oft nach Normierung auch noch gemeinsam ausgewertet wurden. Das ist in den Legenden zu den Abbildungen 10 bis 21, die meine Versuchsergebnisse zeigen, mit angegeben.


In den Primärdaten (oberer Abbildungsteil) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit immer nur ausgewählte Messreihen zur Kinetik der Produktbildung dargestellt. Im unteren Teil der Abbildungen sind die Sekundärdaten, Produktbildungsgeschwindigkeiten (v) und Inhibitionsgeschwindigkeiten (k) von allen zum entsprechenden Versuch durchgeführten Messreihen zu sehen. So waren bereits von anderen Doktoranden die Wechselwirkungen der Propeptide von Cathepsin S und Cathepsin K mit vier menschlichen Cathepsinen untersucht worden (Maubach et al., 1997; Schlabrakowski, 2003). Deren Ergebnisse sind in Tabelle 11, die meine Versuchsplanung und die wichtigsten Ergebnisse zusammenfassend zeigt, zum Vergleich auch mit aufgeführt. Zusammenfassende graphische Darstellungen der K_i - und k_{off} -Werte, auch im Vergleich zu Literaturdaten, befinden sich in der Diskussion (Abb. 22 und 23).


Tabelle 11: Kombinationen von getesteten Propeptiden und der jeweiligen Cathepsine


Propeptide	K_i -Wert (nM)											
	Enzyme											
	Cathepsin H			Cathepsin K			Cathepsin L			Cathepsin S		
hpp CatH (kurz)	4,70	L 2 v		26,5	L 2 u		4,59	L 2 u		183	L 1 v	
hpp CatH (lang)	2,97	L 2 v		4,38	L 2 v		3,59	L 2 v		4,09	K	
hpp CatL	19,7	L 2 u	37,6	0,13	L 1 u	1,74	0,02	L 1 v	0,08	4,73	L 1 u	22,0
hpp CaK	399			0,63			0,18			0,06		
hpp CaS	1086			0,39			5,29			0,05		

 eigene Untersuchungen

 Hemmtyp (anhand eigener Daten bestimmt)

 Schlabrakowski, 2003

 Kontrollmessung Schilling, 2005

 Guo et al., 2000

L ... langsame Bindung

1 ... Ein-Schritt-Reaktion

2 ... Zwei-Schritt-Reaktion

K ... „klassische“, schnelle Inhibition

v ... vollständige Hemmung

u ... unvollständige Hemmung

Nicht in allen Fällen einer Zwei-Schritt-Hemmung wurde mit dem entsprechenden Modell ausgewertet, da für eine unvollständige Zwei-Schritt-Hemmung kein passendes Modell zur Verfügung stand. Manchmal war auch die Messunsicherheit der Inhibitions-geschwindigkeit so groß, dass eine Abschätzung von k_{off} nicht sinnvoll erschien.

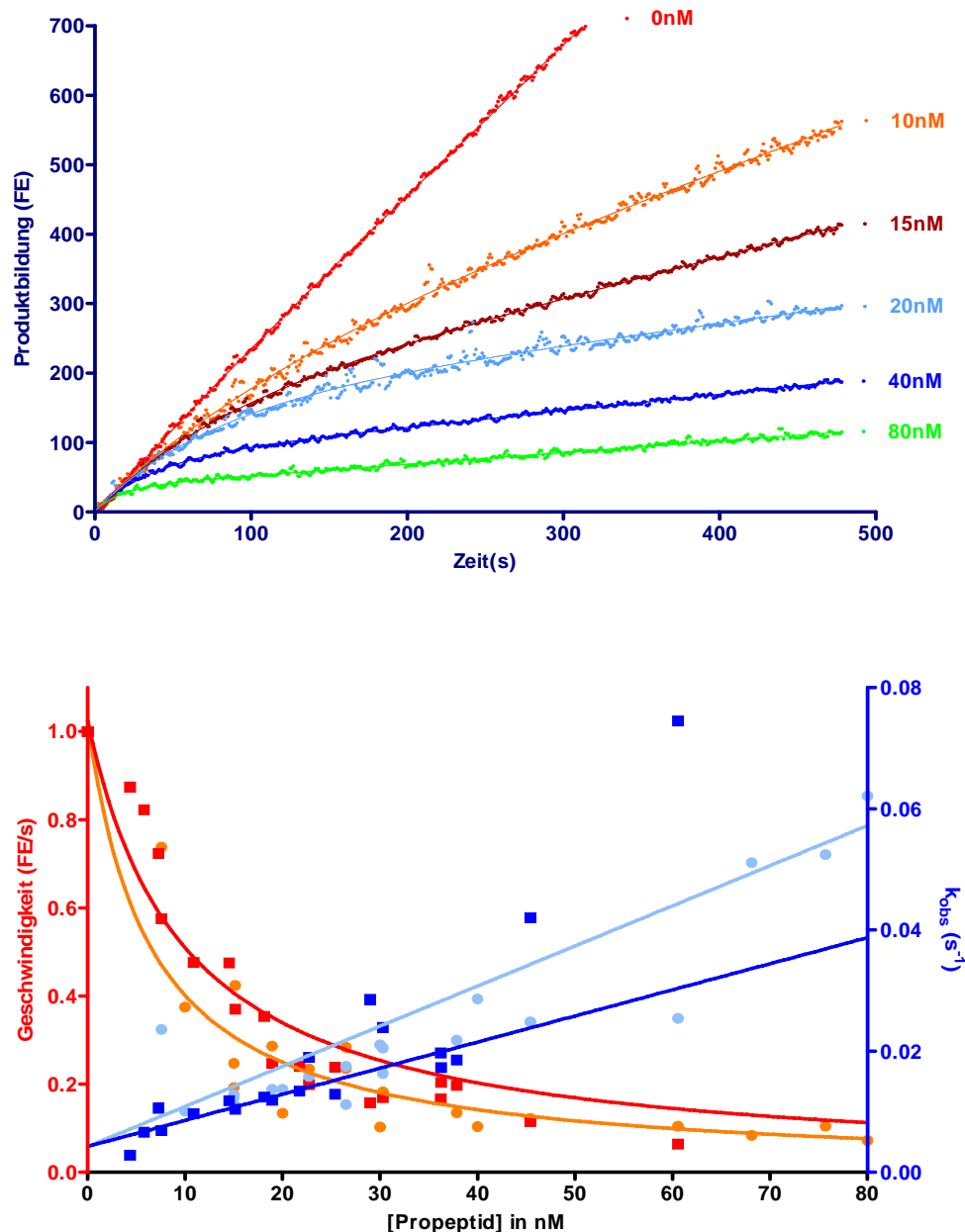


Abb. 10: Vollständige Hemmung von Cathepsin H durch hpp CatH (kurz) in einer Ein-Schritt-Reaktion

Im oberen Teil der Abbildung ist der Zeitverlauf der Produktbildung nach Zusatz von 10 μl aktivierter Enzymlösung zum Standardtestpuffer, der die jeweils an den Kurven angegebene Propeptidkonzentration enthielt, dargestellt. Als Substrat diente H-Arg-AMC in einer Konzentration von 10 μM . Das Propeptid lag in Chromatografiemedium gelöst in einer 49,29 μM Stammlösung vor. Die Einzelheiten des experimentellen Ablaufs sind im Methodenteil (2.4.1) erläutert.

In der unteren Teilabbildung sind die aus den oben gezeigten Primärdaten unter Verwendung von Gleichung 4 berechneten Endgeschwindigkeiten und Krümmungen als Funktion der Inhibitorkonzentrationen angezeigt. Die eingezeichneten Kurven sind das Ergebnis der nicht-linearen Regression unter Verwendung von Gleichung 5 zur Berechnung von K_i —/— (4,700 \pm 0,3913 nM) bzw. der linearen Regression unter Verwendung von Gleichung 7 zur Berechnung von k_{off} —/— (42,51 \pm 2,720 10^{-4} s $^{-1}$). Die Berechnung geht auf vier Versuche zurück, die sich lediglich in der Substratkonzentration (● / ● 10 μM und ■ / ■ 30 μM) unterschieden.

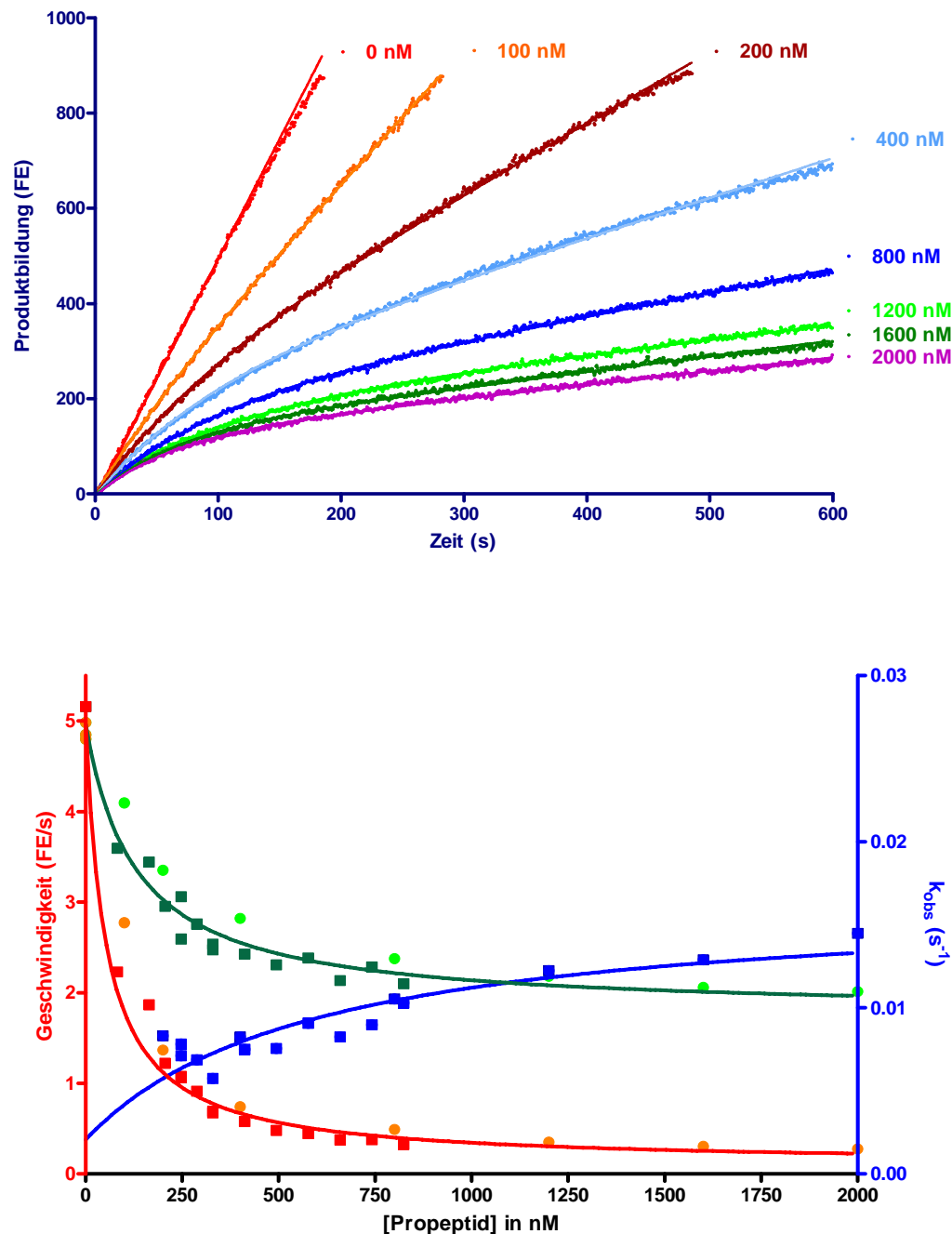


Abb. 11: Unvollständige Hemmung von Cathepsin K durch hpp CatH (kurz) in einer Zwei-Schritt-Reaktion

Im Test wurden Propeptidkonzentrationen von 0 bis 2000 nM und das Substrat Z-Leu-Arg-AMC mit einer Konzentration von 6 μ M verwendet. Die Konzentration der PropeptidstammLösung betrug in diesem Versuch 538 μ M. Die Durchführung der Testreihe erfolgte unter Maßgabe des in Abbildung 9 erwähnten Verweises auf den Methodenteil.

Die im unteren Teil der Abbildung gezeigten Kurven sind Ergebnis aus unabhängig von einander durchgeführten Versuchsreihen, durch die man mit Gleichung 5 bzw. 6 K_i (●/■) ($26,50 \pm 2,431$ nM) und K_i^* (●/■) ($291 \pm 59,4$ nM) berechnen konnte. Zur Berechnung von k_{off} (●) ($20,69 \pm 2,426 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) nutzte ich Gleichung 8.

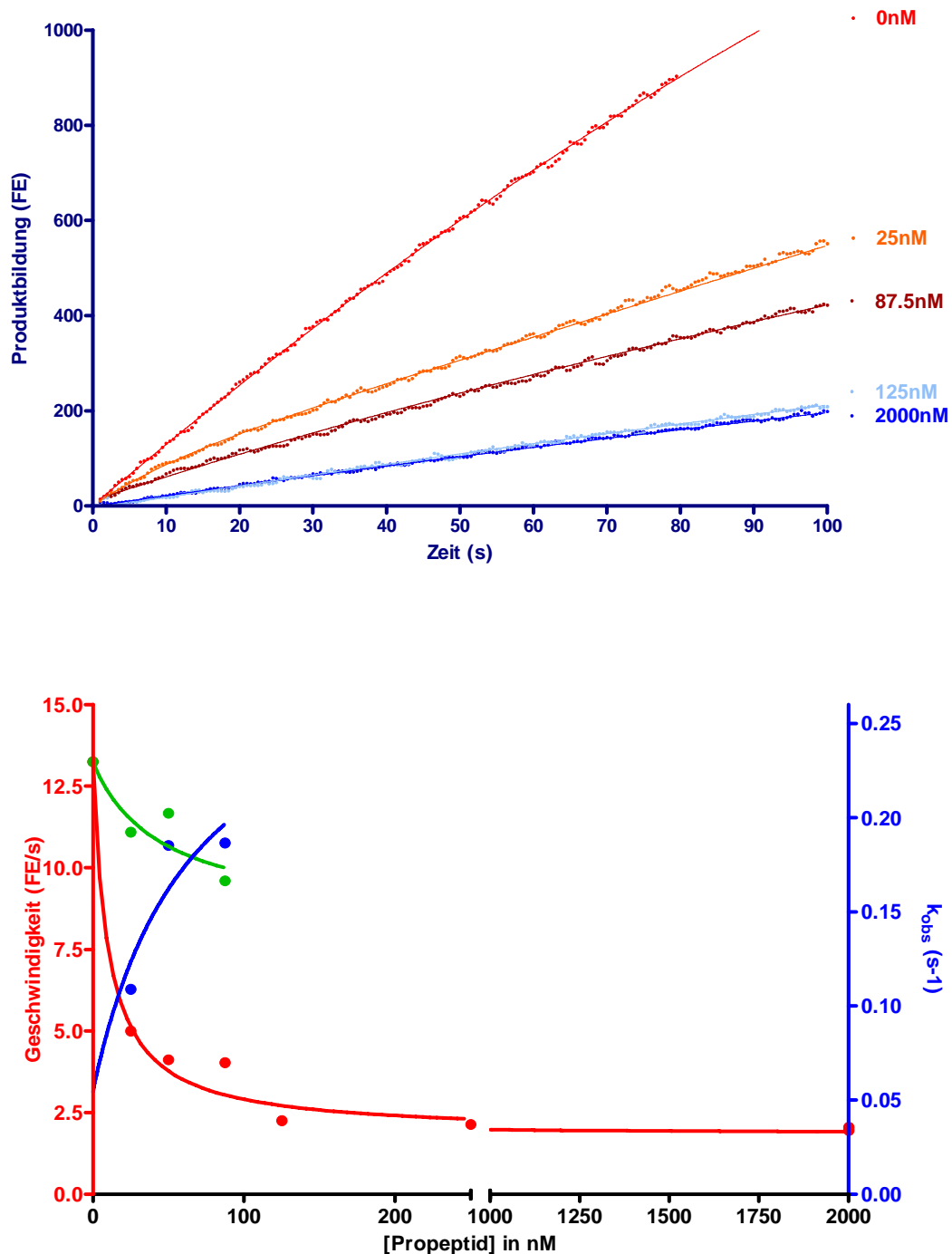


Abb. 12: Unvollständige Hemmung von Cathepsin L durch hpp CatH (kurz) in einer Zwei-Schritt-Reaktion

Im Versuch wurde das Propeptid (Konzentration der Stammlösung 212 μM) von 0 bis 2000 nM getestet. Als Substrat diente Z-Phe-Arg-AMC mit einer Konzentration von 5 μM .

Die Berechnung des K_i (●) ($4,598 \pm 0,751$ nM) erfolgte mit der Gleichung 5, die des k_{off} -Wertes ($544,8 \pm 36,07 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) mit Gleichung 8. Wegen der geringen Zahl an Messpunkten ist die Bestimmung von K_i^* (●) nicht möglich.

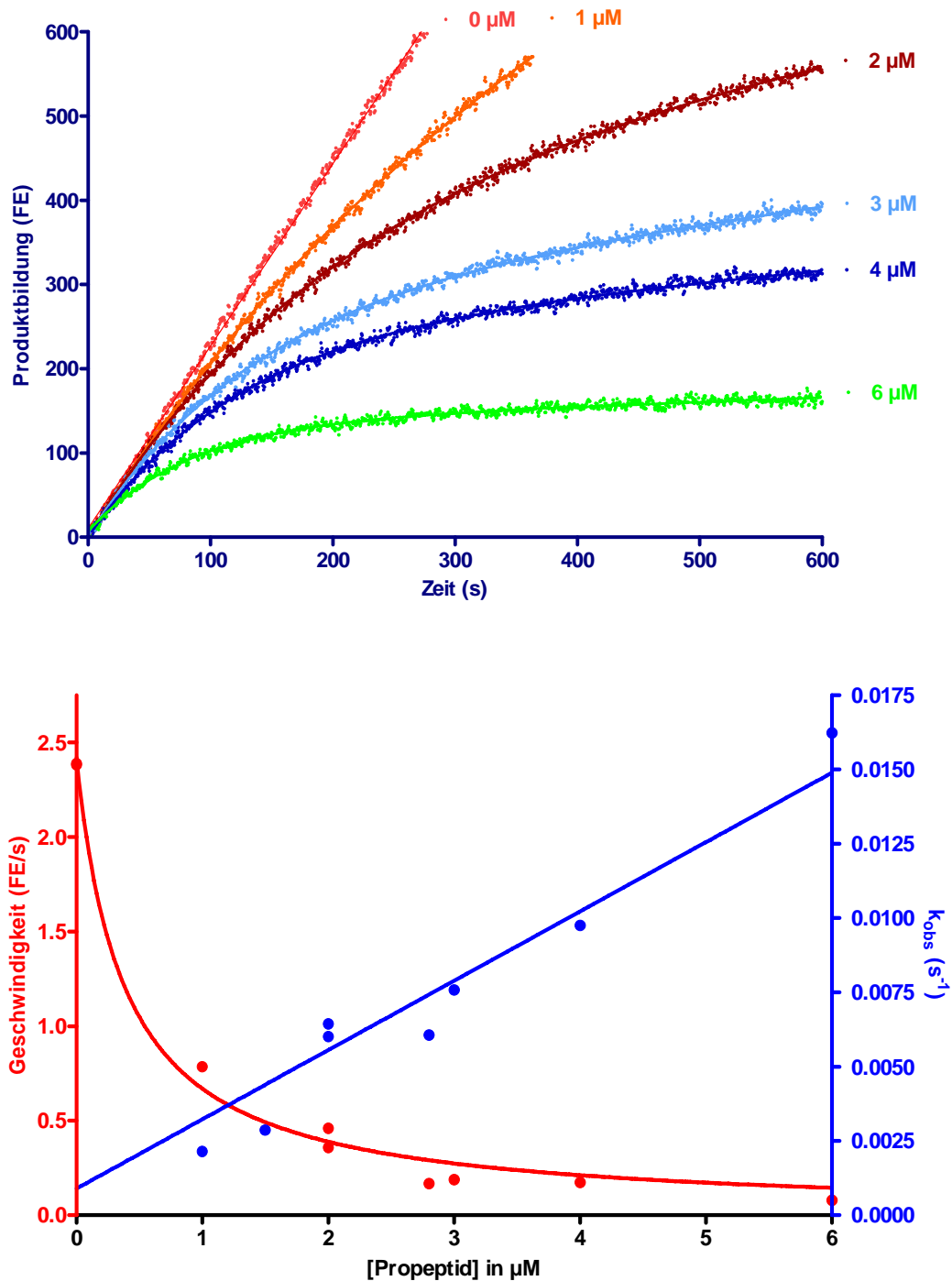


Abb. 13: Vollständige Hemmung von Cathepsin S durch hpp CatH (kurz) in einer Ein-Schritt-Reaktion

Die Propeptidstammlösung betrug in diesem Versuch 212 μM . Als Substrat wurde Z-Val-Val-Arg-AMC mit einer Konzentration von 20 μM verwendet. K_i ($183,4 \pm 13,16$ nM) und k_{off} ($8,927 \pm 0,042 \cdot 10^{-4} \times s^{-1}$) wurden, wie in Abbildung 9 beschrieben, ermittelt.

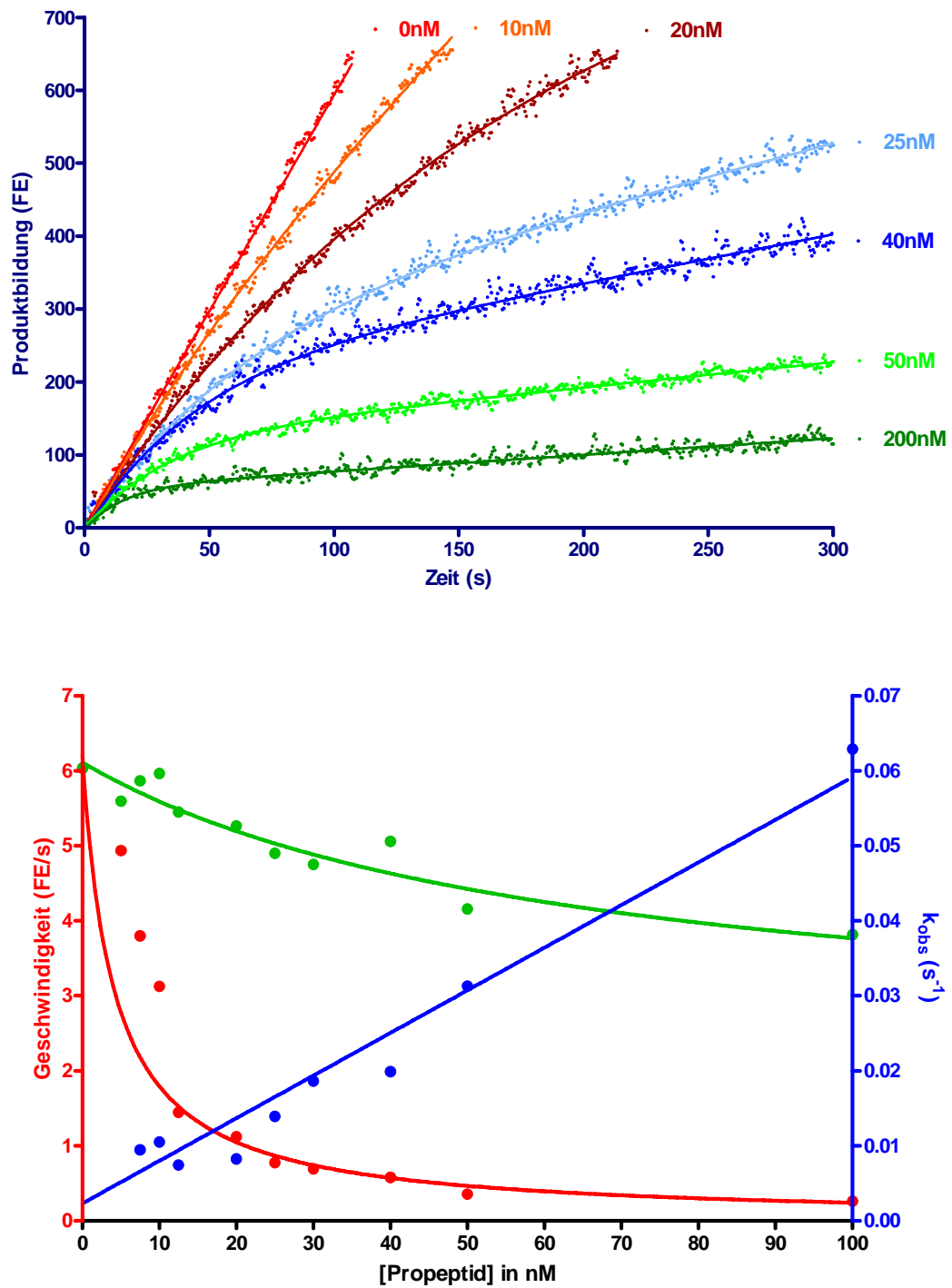


Abb. 14: Vollständige Hemmung von Cathepsin H durch hpp CatH (lang) in einer Zwei-Schritt-Reaktion

Die Substratkonzentration betrug $10 \mu\text{M}$ (H-Arg-AMC). Der K_i ($2,975 \pm 0,356 \text{ nM}$) und K_i^* ($93,6 \pm 9,2 \text{ nM}$) wurde mit Gleichung 5 und 6 ermittelt und k_{off} ($23,10 \pm 1,024 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) mit Gleichung 7.

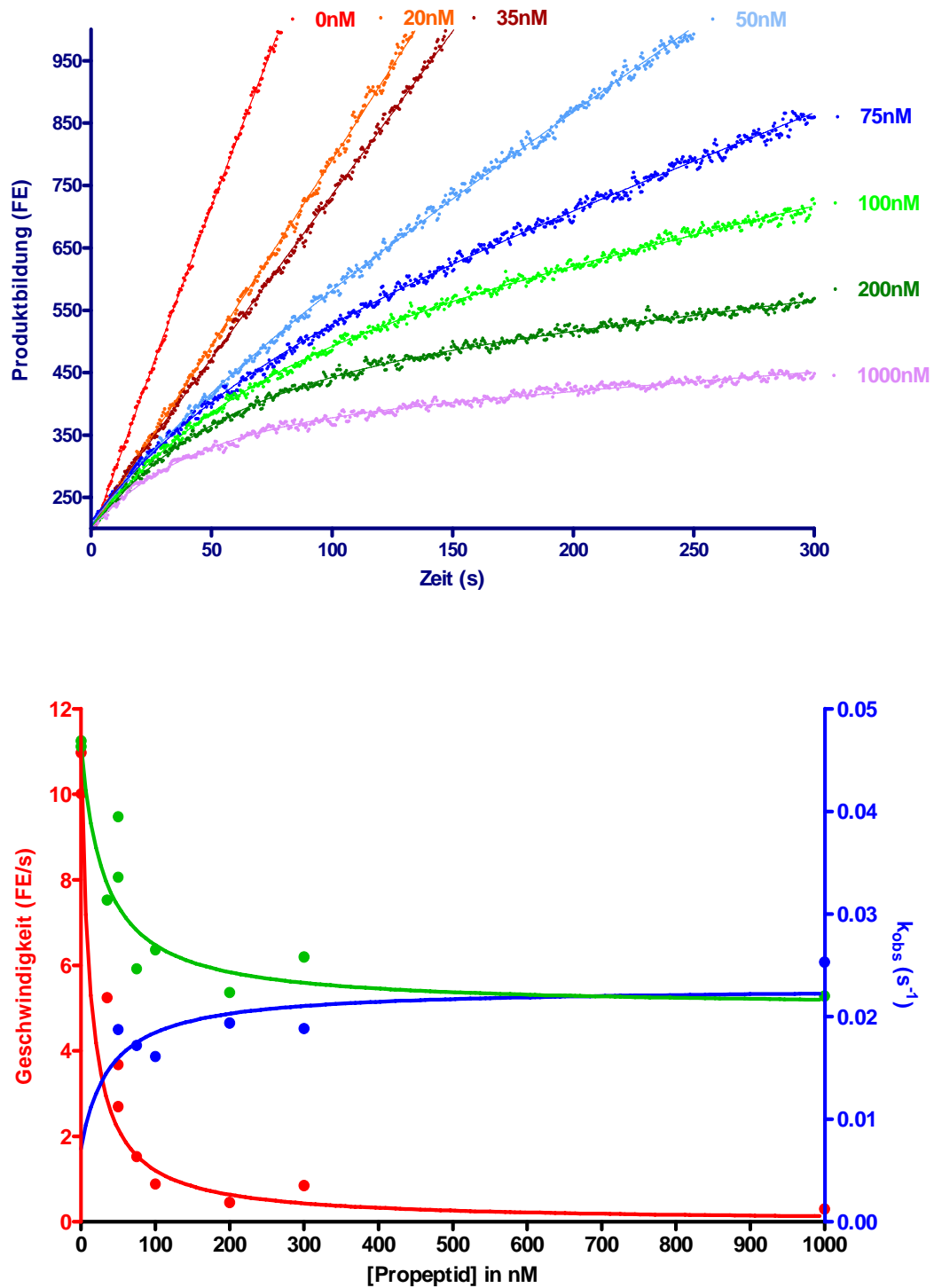


Abb. 15: Vollständige Hemmung von Cathepsin K durch hpp CatH (lang) in einer Zwei-Schritt-Reaktion

Das Substrat Z-Leu-Arg-AMC wurde als 10 μ M Lösung eingesetzt. Alle anderen Bedingungen entsprachen denen in Abbildung 9 beschriebenen. Die Inhibitionskonstanten K_i ($4,381 \pm 0,721$ nM), K_i^* ($15,8 \pm 5,9$ nM) und k_{off} ($71,08 \pm 24,39 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) wurden unter Verwendung der Gleichungen 5, 6 und 8 berechnet.

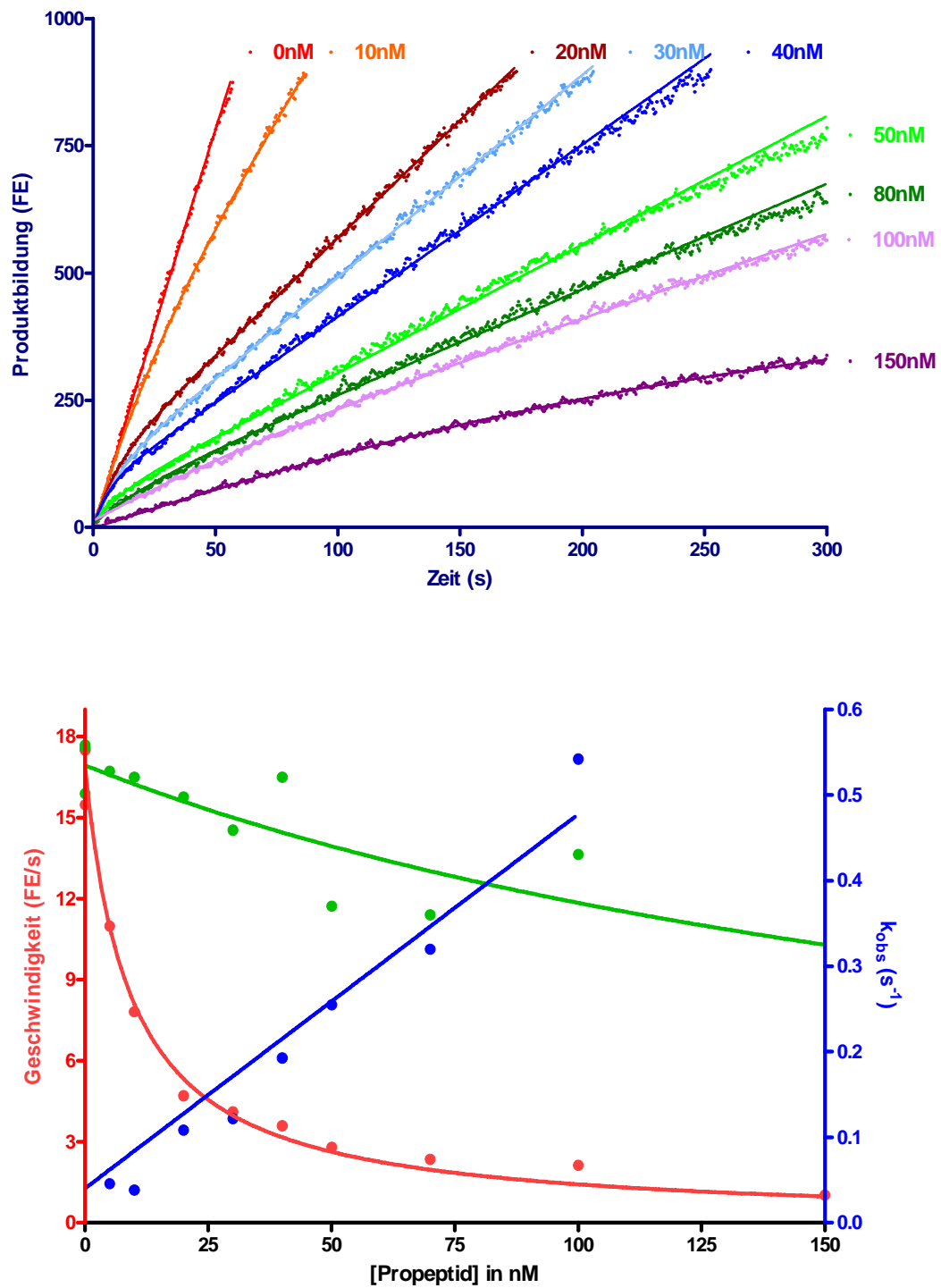


Abb. 16: Vollständige Hemmung von Cathepsin L durch hpp CatH (lang) in einer Ein-Schritt-Reaktion

Das Substrat Z-Phe-Arg-AMC wurde als 5 μ M Lösung eingesetzt. Alle anderen Bedingungen entsprachen denen in Abbildung 9 beschrieben. Die Inhibitionskonstanten K_i ($3,588 \pm 0,201$ nM), K_i^* ($52,2 \pm 16,5$ nM) und k_{off} ($71,08 \pm 24,39 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) wurden unter Verwendung der Gleichungen 5, 6 und 7 berechnet.

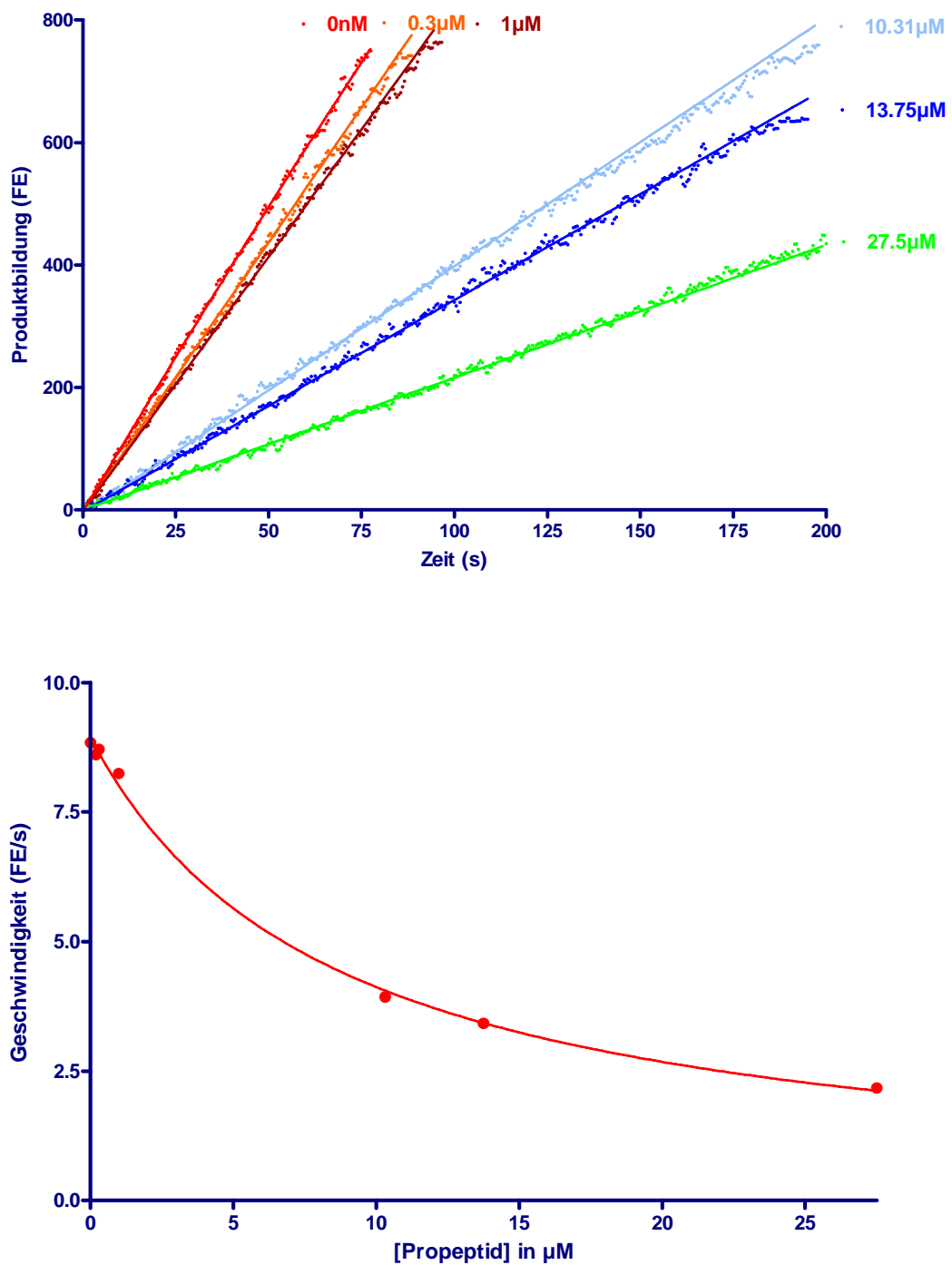


Abb. 17: Klassische Hemmung ($K_i > 0,1\mu\text{M}$) von Cathepsin S durch hpp CatH (lang)

Die Testbedingungen wurden wie in Abbildung 9 beschrieben durchgeführt. Als Substrat diente Z-Val-Val-Arg-AMC mit einer Konzentration von $20\mu\text{M}$. Die Berechnung des K_i ($4,096\pm 0,192\text{ nM}$) und K_i^* ($4096\pm 192,0\text{ nM}$) erfolgte mit Gleichung 5 und 6.

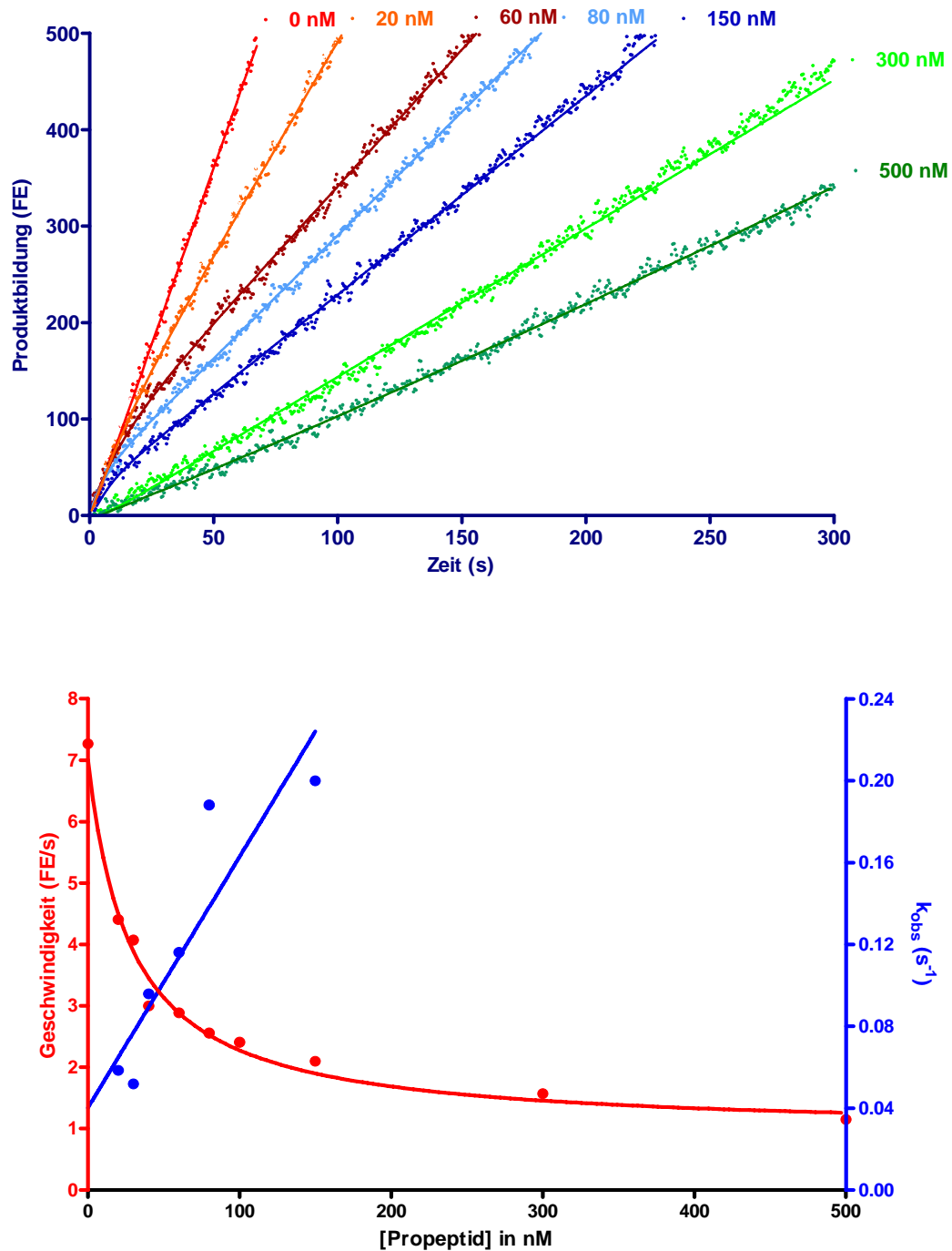


Abb. 18: Unvollständige Hemmung von Cathepsin H durch hpp CatL in einer Zwei-Schritt-Reaktion

Die Testreihe wurde unter den in Abbildung 9 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Konzentrationen der Propeptidstammlösung und des Substrats (H-Arg-AMC) betrugen 88 μ M und 15 μ M. Der K_i -Wert ($19,63 \pm 1,969$ nM) ist Ergebnis der nicht-linearen Regression unter Verwendung der Gleichung 6. Mit Gleichung 8 konnte in linearer Regression k_{off} ($402,3 \pm 34,92 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) ermittelt werden.

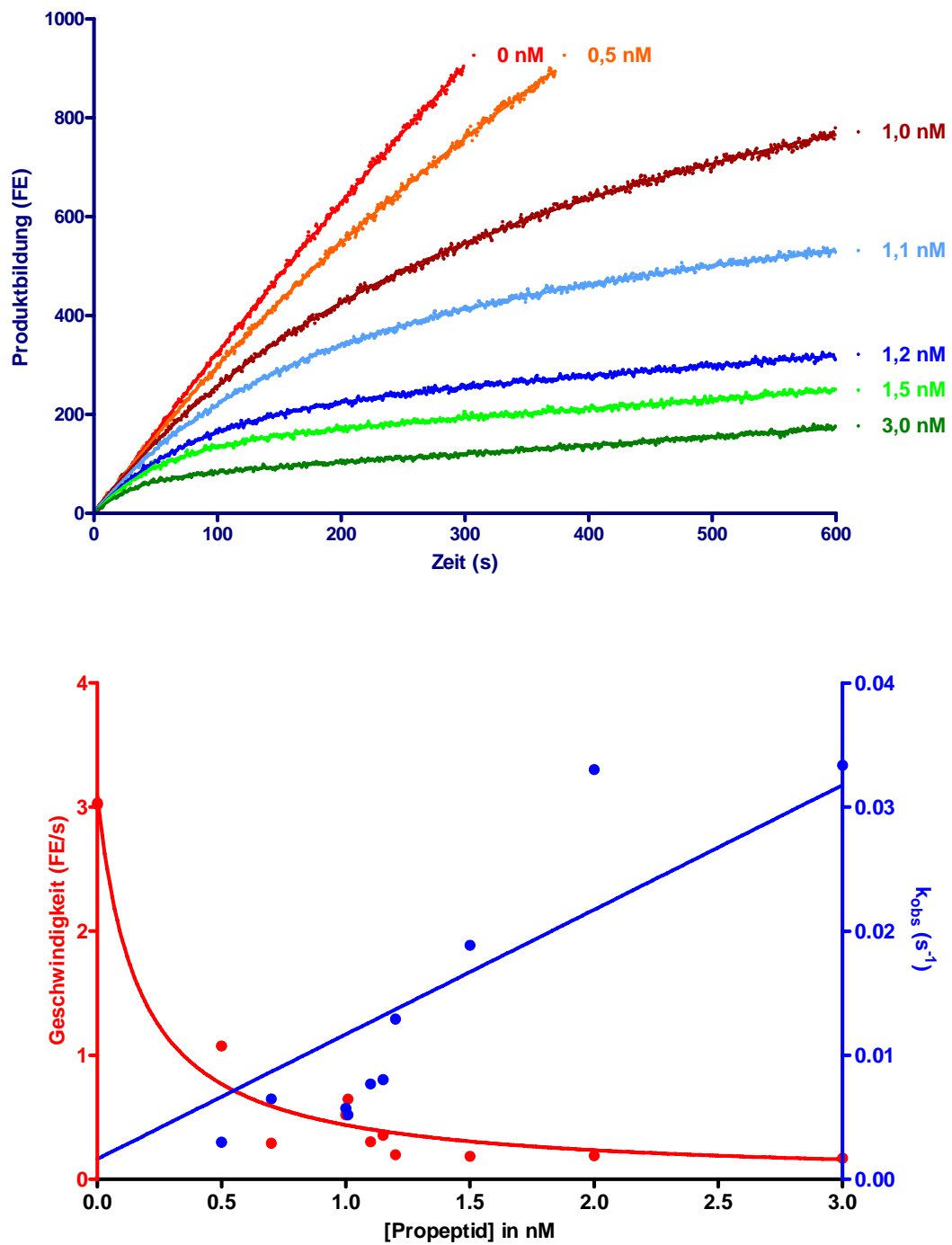


Abb. 19: Unvollständige Hemmung von Cathepsin K durch hpp CatL in einer Ein-Schritt-Reaktion

Die Konzentrationen der Propeptidstammlösung und des Substrats (Z-Leu-Arg-AMC) betrugen $182 \mu\text{M}$ und $6 \mu\text{M}$. K_i ($0,125 \pm 0,021 \text{ nM}$) wurde mittels Gleichung 5 und k_{off} ($17,48 \pm 1,16 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) mit Gleichung 7 berechnet.

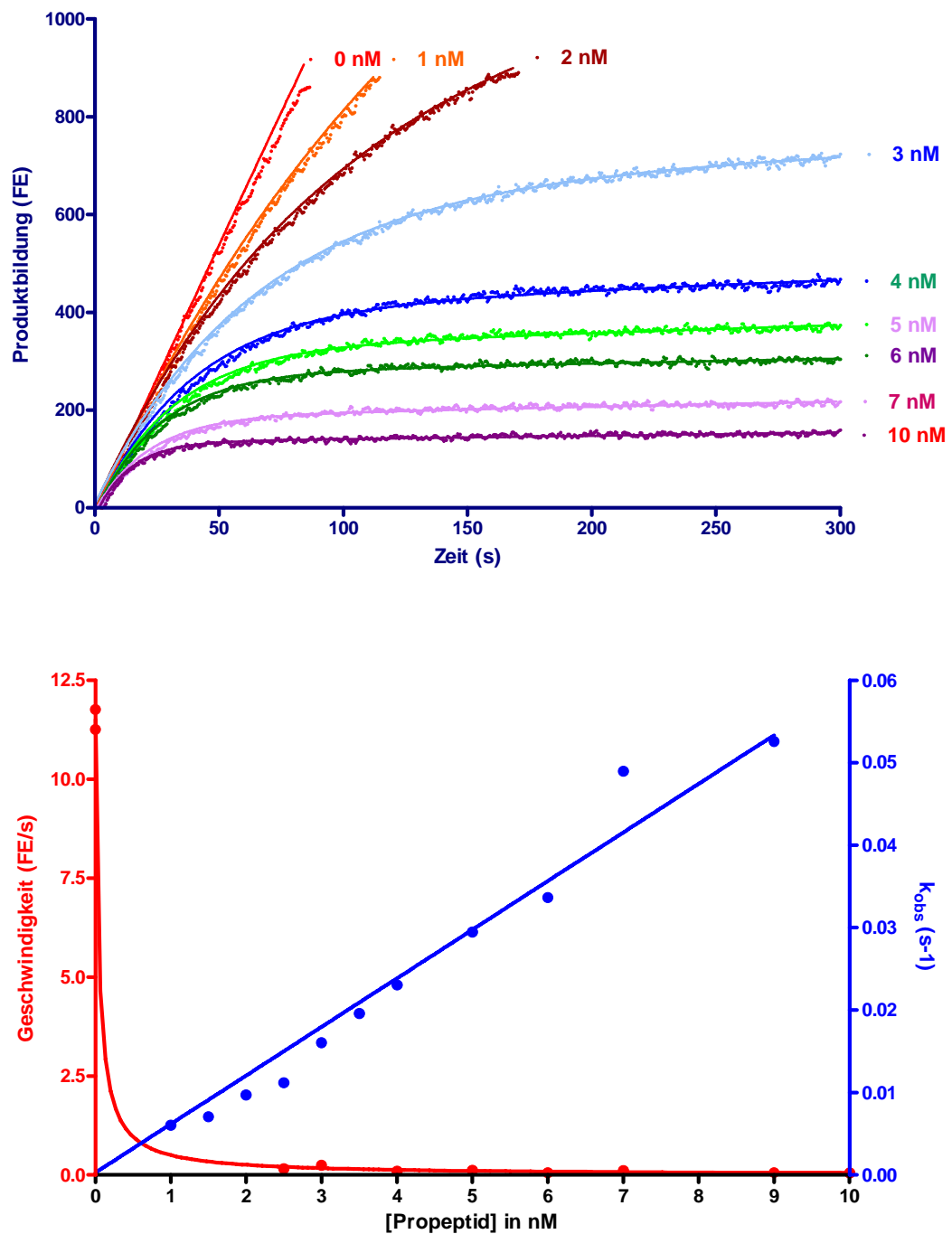


Abb. 20: Vollständige Hemmung von Cathepsin L durch hpp CatL in einer Ein-Schritt-Reaktion

Die Versuchsbedingungen entsprachen des in Abbildung 9 bereits verwiesenen Methodikteils. Die Konzentration des Substrats (Z-Phe-Arg-AMC) betrug $6 \mu\text{M}$ und die der PropeptidstammLösung $13,2 \mu\text{M}$. Die Werte der Inhibitionskonstanten K_i ($0,018 \pm 0,005 \text{ nM}$) und k_{off} ($2,808 \pm 0,258 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) wurden mit den Gleichungen 5 und 7 ermittelt.

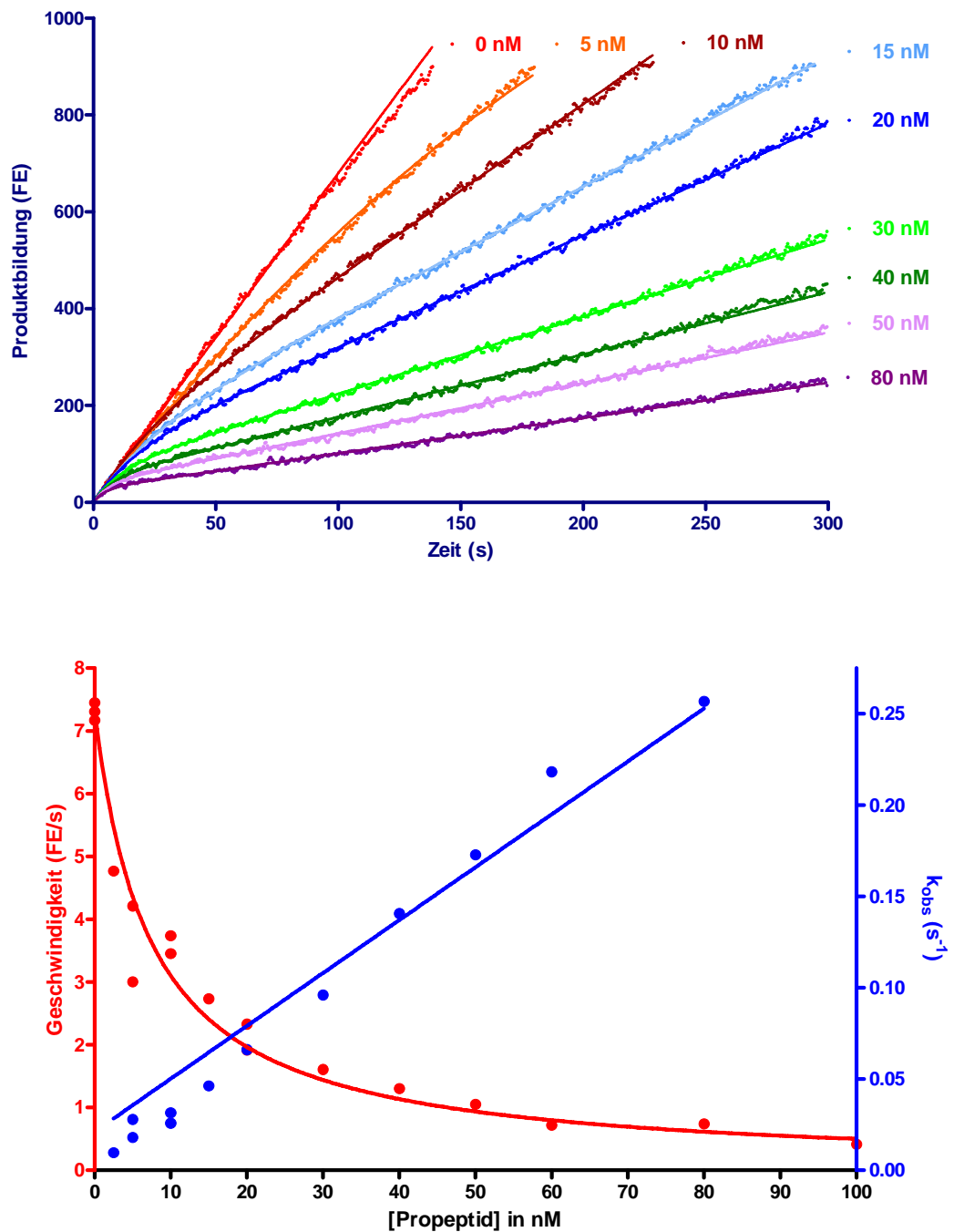


Abb. 21: Langsame unvollständige Hemmung von Cathepsin S durch hpp CatL in einer Ein-Schritt-Reaktion

Die Testreihe wurde unter den in Abbildung 9 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Konzentrationen der Propeptidstammlösung und des Substrats (Z-Val-Val-Arg-AMC) betrugen 88 μ M und 10 μ M. K_i ($4,730 \pm 0,2955$ nM) wurde mittels Gleichung 5 in nicht-linearer Regression und k_{off} ($211,5 \pm 8,175 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) mit Gleichung 7 in linearer Regression berechnet.

4. Diskussion

Die Hauptfunktion der Propeptide bei den Cysteinproteasen der Papainfamilie ist die Hemmung der proteolytischen Aktivität ihrer Mutterenzyme, das ist das eindeutige Ergebnis einer größeren Zahl von strukturellen und funktionellen Untersuchungen.

Die entscheidenden strukturellen Untersuchungen stammen aus dem Jahr 1996, als die Ergebnisse der Röntgenstrukturuntersuchungen für die Zymogene der Prototypen der beiden damals bekannten Unterfamilien, die Procathepsine B und L veröffentlicht wurden (Turk et al., 1996; Cygler et al., 1996; Coulombe et al., 1996). Die Struktur des reifen Cathepsin B war schon länger bekannt (Musil et al., 1991), die des reifen Cathepsin L folgte 1997 (Fujishima et al.). Es zeigte sich, dass die Strukturen der katalytischen Zentren beider Zymogene und die des jeweiligen reifen Enzyms praktisch identisch sind, d.h. die Zymogene sind potentiell aktiv. Es ist aber keine Substrateinlagerung möglich, weil dieser Teil bei beiden Enzymen in fast gleicher Weise von ihren Proregionen blockiert wird. Die später publizierten Strukturdaten zu den verwandten Procathepsinen K und S bestätigten diesen Sachverhalt (LaLonde et al., 1999; Kaulmann et al., 2006).

Die funktionellen Untersuchungen begannen schon etwas früher. 1992 synthetisierten Fox und Mitarbeiter das etwa 60 Aminosäuren lange Propeptid vom Cathepsin B und zeigten, dass es sein Mutterenzym in einer langsamen Ein-Schritt-Reaktion sehr stark inhibiert ($K_i = 0,4 \text{ nM}$), ohne dass es dabei proteolytisch gespalten wird. 1995 wurden von Taylor und Mitarbeitern die etwa 110 Aminosäuren langen Propeptide von zwei Pflanzenenzymen, Papain und Papayaproteinase IV gentechnisch hergestellt und ihre inhibitorische Potenz gegenüber den beiden Mutterenzymen und den nahe verwandten Chymopapain und Caricain in Über-Kreuz-Experimenten getestet. Die Hemmwirkung gegenüber den jeweiligen Mutterenzymen war am besten ($K_i = 2 \text{ nM}$ für Papain und 860 nM für Papayaproteinase IV). Der Unterschied von mehr als zwei Größenordnungen in der Hemmwirkung bei einer Sequenzhomologie von 67% zwischen den untersuchten Enzymen und mehr als 80% zwischen den Propeptiden war ein überraschendes Ergebnis. Die Autoren diskutierten, dass vermutlich die sehr enge Substratbindungsstelle der Papayaproteinase IV den Zugang der Propeptide erschwert. Das stellt sich unter Berücksichtigung der späteren Untersuchungen mit systemisch verkürzten Propeptiden bei anderen Enzymen inzwischen etwas anders dar, denn der Beitrag der Aminosäurereste des Propeptids, die sich in die Substrat-bindenden Taschen

einlagern, zur gesamten Hemmwirkung ist vergleichsweise gering (Carmona et al., 1996; Chen et al., 1996). Bei den Cathepsin L ähnlichen Cysteinproteasen, zu denen auch das Papain gehört, scheinen die sich kreuzenden Helices in der Unterfamilienspezifischen Prodomäne einen entscheidenden Beitrag zur Bindung zu leisten, indem sie deren strukturelles Rückgrat bilden (Guo et al., 2000). Auch die generell deutlich schlechtere Hemmwirkung der pflanzlichen Propeptide im Vergleich zu den tierischen wurde erst deutlich, als in den folgenden Jahren noch zahlreiche Propeptide vor allem von menschlichen Cathepsinen untersucht wurden. Die kleinsten Hemmkonstanten gegenüber ihren Mutterenzymen sind für die Propeptide der Cathepsine L und S publiziert worden ($K_i = 0,088 \text{ nM}$; Carmona et al., 1996 bzw. $0,055 \text{ nM}$; Guo et al., 2000). Es gibt aber auch Berichte über deutlich höhere K_i -Werte (Guay et al., 2000; Maubach et al., 1997). Diese Differenzen liegen vermutlich nur zum Teil an den unterschiedlichen Messbedingungen, sie könnten auch methodischen Unzulänglichkeiten zuzuschreiben sein, denen vor allem bei der Bestimmung der Inhibitionskinetik von Cathepsin K durch sein Propeptid sorgfältig nachgegangen wurde. Hier gab es Differenzen von ein bis zwei Größenordnungen zwischen den publizierten Daten bei pH 6,0 z.B. von 0,35 bis 5,5 nM (Billington et al., 2000; Guay et al., 2000; Schlabrakowski, 2003; Kleint, 2003). Eine mögliche Fehlerquelle ist beispielsweise die starke Hydrophobizität mancher Propeptide, die zur Bindung an Kunststoffoberflächen führt. Das verringert die wirksame Konzentration in den Tests und damit natürlich auch den Hemmeffekt. Die Folge sind zu große K_i -Werte (Kleint, 2003). Alle bisher untersuchten tierischen Enzyme werden von ihren Propeptiden in einer langsamen Ein-Schritt-Reaktion gehemmt, bei den Pflanzenenzymen gibt es leider keine Daten zur Kinetik der Hemmwirkung.

Ich habe drei bisher nicht verfügbare Propeptide gentechnisch hergestellt und charakterisiert. Vom Cathepsin L Propeptid waren zwar schon Teilabschnitte in Hefe exprimiert und bezüglich ihrer Hemmwirkung charakterisiert worden (Carmona et al., 1996), es gelang dieser Gruppe damals aber nicht, die vollständige Sequenz herzustellen. An beiden Enden fehlten insgesamt mehr als 10 Aminosäuren.

In der Jenaer Gruppe sind bisher insgesamt sechs Propeptide von menschlichen Cathepsinen erfolgreich in Bakterien exprimiert worden, da lag es nahe, auch das komplette Propeptid des Cathepsin L zu untersuchen. Das gelang ohne Schwierigkeiten und ich konnte eine Verbesserung der Hemmwirkung durch die Verwendung des vollständigen Propeptids zeigen, der K_i verringerte sich auf einen Wert von 18 pM, das

liegt in der Größenordnung der besten in der Natur vorkommenden Inhibitoren, z.B. der Cystatine (Hühnereiweiß-Cystatin hemmt Papain mit einem K_i von 5 pM; Turk und Bode, 1991) Daraus kann man schlussfolgern, dass es beim Cathepsin L eine perfekte Co-Evolution zwischen dem Enzym und seiner Proregion gab. Das ist bei anderen Vertretern der Papainfamilie offensichtlich ganz anders verlaufen, darauf wird später eingegangen. Eine bessere Hemmwirkung des von mir verwendeten vollständigen Cathepsin L Propeptids im Vergleich zu dem unvollständigen von Carmona und Mitarbeitern war deshalb zu erwarten, weil diese Autoren ihr Konstrukt auch noch schrittweise weiter verkürzt hatten und dabei Anstiege des K_i -Wertes um Größenordnungen fanden. Fehlten mehr als die Hälfte der 96 Aminosäuren der Datenbanksequenz, konnte von einer effektiven Hemmung nicht mehr gesprochen werden ($K_i = 2,9 \mu\text{M}$; Carmona et al., 1996).

Zur Inhibition von Cathepsin H durch sein Propeptid gab es bisher überhaupt noch keine Untersuchungen, obwohl gerade dieses Enzym aus zwei Gründen ein ausgesprochen interessantes Objekt ist:

1. Es gehört zwar zur Cathepsin L-ähnlichen Unterfamilie, hat aber einen großen evolutionären Abstand zu den übrigen Mitgliedern.
2. Bei der *in-vivo* Prozessierung der Proform zum reifen Enzym verbleibt ein Teil der Prosequenz kovalent durch eine Disulfidbrücke in der Substrat-bindenden Spalte des Enzyms als so genannte Minikette gebunden (Barrett und Kirschke, 1981; Takahashi et al., 1988; Nishimura und Kato, 1988; Koga et al., 1992; Gunčar et al., 1998; Dolinar et al., 2000). Die Minikette ist die strukturelle Grundlage der Aminopeptidase-Funktion (Vasiljewa et al., 2003). Dieser Sachverhalt führt auch in der Datenbank zu Schwierigkeiten bei der Definition des Propeptids vom Cathepsin H, denn bei der Prozessierung kommt es beidseits der Minikette zur limitierten Proteolyse und beim Homologievergleich (Abb. 2) ist die Minikette zweifelsfrei Teil der Prosequenz.

Aus diesen Gründen habe ich zwei Konstrukte exprimiert, einmal den Teil der Prosequenz der sich N-terminal an die Minikette anschließt und zum anderen die aus dem Homologievergleich mit den übrigen Enzymen der Unterfamilie abgeleitete komplette Prosequenz. Beide Propeptide unterscheiden sich in der Länge am C-Terminus um 30 Aminosäuren, hemmen aber das Mutterenzym mit etwa der gleichen Effizienz, die lange Form sogar etwas besser als die kürzere (3,0 bzw. 4,7 nM). Das war

nicht unbedingt zu erwarten, denn die Minikette behindert zweifellos die Bindung des C-terminalen Abschnitts der langen Form des Propeptids. Diese Blockade scheint aber nicht zu verhindern, dass sich der N-terminale globuläre Teil des Propeptids korrekt ans Enzym anlagert und den Substratzugang mit einem K_i verhindert, der zwar um ein bis zwei Größenordnungen schlechter als der bei den verwandten tierischen Cathepsinen ist, aber gut mit dem des pflanzlichen Prototypen der Familie, dem Papain (2 nM) und einer Cathepsin L ähnlichen Protease des einzigen bisher untersuchten Einzellers, *Paramecium tetraurelia*, (2,6 nM) übereinstimmt (Gou et al., 2000). Es fällt auch auf, dass beide hpp CatH-Formen ihr Mutterenzym in einer Zwei-Schritt-Reaktion inhibieren, ebenfalls im Unterschied zu allen übrigen Paaren. Das spricht für eine Strukturoptimierung eines der beiden Partner im Verlauf der Reaktion. Das Propeptid bildet im ersten Teilschritt einen lockeren Komplex mit dem Mutterenzym und ändert im zweiten Schritt durch die enge räumliche Nachbarschaft seine Struktur so, dass es sich perfekt an die Enzymstruktur anpasst. Das führt zu der beobachteten erheblichen Verbesserung der Hemmwirkung. Solche Strukturanpassungen sind bei anderen Proteinen, vor allem Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, schon lange bekannt und werden allgemein als induzierte Anpassung bezeichnet (induced fit; Koshland, 1976). Prinzipiell könnte sich auch die Enzym- an die Propeptidstruktur anpassen, das ist in diesem Fall aber unwahrscheinlich, denn die Struktur der reifen Cathepsine ist wesentlich stabiler als die ihrer Propeptide (Schilling et al., 2001; Pietschmann et al., 2002). Ein ähnliches Verhalten zeigt auch das Propeptid der Cathepsin L ähnlichen Protease aus *Paramecium tetraurelia*, sodass der Gedanke nahe liegt, dass es sich in beiden Fällen um eine frühe, im Verlauf der Evolution noch nicht optimierte Form der Wechselwirkung zwischen Enzym und Propeptid handeln könnte. Ob das für Cathepsin H tatsächlich zutrifft, kann aber aus den bisherigen Versuchen nicht zweifelsfrei geschlossen werden. Dazu müsste man prüfen, welche Inhibitionskinetik sich mit einer Cathepsin H Mutante, der die Minikette fehlt, durch die lange Form des Propeptids ergibt. Eine solche Mutante wurde bereits hergestellt (Vasiljeva et al., 2003). Sie hat die Aminopeptidaspezifität verloren, funktioniert also wie eine Endopeptidase (Vasiljeva et al., 2003; Dodt und Reichwein, 2003).

Das Hauptziel meiner Arbeit war die systematische Untersuchung der Selektivität. Diese Frage der Selektivität ist nicht neu, sie wurde in den meisten der bisher zitierten Untersuchungen schon mit untersucht, jeweils mit dem gerade verfügbaren Propeptid und einigen Enzymen aus der Papainfamilie. Dabei stellte sich übereinstimmend heraus,

dass die Propeptide ihre Mutterenzyme nicht mit absoluter Spezifität hemmen. Zwischen nahe verwandten Enzymen gab es Kreuzreaktivitäten, falls aber Propeptide und Enzyme aus verschiedenen Unterfamilien (z.B. Cathepsin L- und B-ähnliche Endopeptidasen) oder aus einer Unterfamilie, aber sehr verschiedenen Organismen (z.B. Pflanzen und Tiere) stammten, wurde keine oder nur eine sehr geringe Hemmwirkung beobachtet (Carmona et al., 1996; Maubach et al., 1997; Guay et al., 2000). Systematische Vergleiche waren aber durch eine einfache Zusammenstellung der Daten verschiedener Arbeitsgruppen nicht möglich, denn die Testbedingungen waren extrem unterschiedlich, angefangen vom pH bis zum Zusatz organischer Lösungsmittel. Im Jahr 2000 publizierten Guay und Mitarbeiter die erste standardisierte Untersuchung mit drei Propeptiden humaner Cathepsine (L, K, S) und vier Enzymen (Cathepsine L, K, S, B). Die Aussage der Studie ist allerdings dadurch begrenzt, dass ein pH von 5,5 gewählt wurde, mit der Begründung, dass dort drei der untersuchten Enzyme ihr Aktivitätsoptimum haben. Die Tatsache ist aber für die untersuchte Fragestellung ohne Bedeutung, denn alle vier Enzyme sind fast bis zum Neutralpunkt aktiv und stabil (Turk et al., 1993 und 1994; Turk et al., 1995). Besser wäre gewesen, einen pH zu wählen, wo die Hemmwirkung der Propeptide gegenüber ihren Mutterenzymen optimal ist, und das ist zumindest beim Cathepsin S nur oberhalb von pH 6,0 der Fall (Maubach et al., 1997). Bei allen bisher untersuchten Propeptiden lässt die Hemmwirkung gegenüber dem Mutterenzym mit sinkendem pH nach, am stärksten beim Cathepsin S, da kann bei pH 4,0 überhaupt keine Hemmung mehr festgestellt werden (Maubach et al., 1997), am geringsten ist der Einfluss des pH beim Cathepsin K (Kleint, 2004). Dieses Problem wurde von Guay und Mitarbeitern erst in der Diskussion angesprochen, als die Differenzen zwischen den eigenen und den publizierten Daten kommentiert werden mussten. Die K_i -Werte aus dieser Arbeit sind in Abbildung 22 zum Vergleich in der gleichen Art wie die eigenen Ergebnisse dargestellt, darauf wird am Ende der Diskussion nochmals kurz eingegangen.

In der Jenaer Gruppe war auch mit Untersuchungen zur Selektivität begonnen worden, grundsätzlich bei pH 6.5. Die erste diesbezügliche Publikation umfasste nur die Cathepsine S und L von Mensch und *Paramecium*, enthielt aber neben einfachen Überkreuz-Messungen auch noch die Daten zur Hemmwirkung von chimären Formen der beiden Propeptide, aus denen die bereits vorn erwähnte Schlussfolgerung gezogen wurde, dass bei den Zymogenen der Cathepsin L-ähnlichen Unterfamilie der N-terminale, globuläre Teil der Proregion die Selektivität bedingt (Guo et al., 2000).

Der nächste Schritt war die erfolgreiche Expression des Propeptids vom Cathepsin K (Schlabrakowski, 2002). Zusammen mit den vorhandenen Propeptiden der humanen Cathepsine S und L wurden damit Über-Kreuz-Untersuchung mit vier Enzymen, den drei Mutterenzymen und Cathepsin H, durchgeführt. Das interessanteste Ergebnis war die vergleichsweise schlechte Inhibition von Cathepsin H durch alle drei Propeptide. Da die Raumstruktur der Proregion vom Cathepsin H noch nicht aufgeklärt ist, wurde ein Vergleich der Primärstrukturen vorgenommen, der ergab kleinere Unterschiede zwischen dem Propeptid vom Cathepsin H und denen der drei anderen Cathepsine im Bereich der Prodomäne. Computergestützte Homologie-Modellierung zeigte dann im Bereich der Kontaktstelle zwischen der Prodomäne und der Propeptid-bindenden Schleife des Enzyms den Unterschied zu den verwandten Zymogenen: eine um etwa vier Aminosäuren verkürzte α 2-Helix, kompensiert durch die entsprechend verlängerte Schleife beim Übergang zum β ₁-Faltblatt (Schlabrakowski, 2002). Weitere Schlussfolgerungen waren wegen der fehlenden Daten zur Hemmwirkung des Propeptids von Cathepsin H nicht möglich, es stand ja noch nicht zur Verfügung.

Mit den neu hergestellten Propeptiden setzte ich die Über-Kreuz Inhibitionsstudien mit den Cathepsinen H, K, L und S unter den bisherigen Standardbedingungen fort. Damit stehen jetzt die Daten von insgesamt 20 methodisch vergleichbaren Versuchen zur Bestimmung der Selektivität der Propeptide bei den Cathepsin L-ähnlichen Peptidasen zur Diskussion zur Verfügung. Davon stammen zwölf Datensätze aus eigenen Messungen, die übrigen acht wurden aus den ausführlich zitierten Voruntersuchungen übernommen. Letztere sind auch in einer einschlägigen Übersichtsarbeit detailliert tabelliert (Wiederanders et al., 2003). Abbildung 22 zeigt die K_i und k_{off} -Werte. Nachfolgend werden einzelne Aspekte diskutiert, die sich aus einem Vergleich der Hemmwirkung der fünf untersuchten Propeptide ergeben.

1. Die beiden Varianten des Propeptides vom Cathepsin H verhalten sich ähnlich, sie hemmen ihr Mutterenzym vergleichsweise schlecht und zeigen gegenüber den drei anderen Enzymen vergleichbare Hemmwirkung. Die Übereinstimmung bezüglich der Inhibition des Mutterenzym ist nicht überraschend, denn beide Formen des Propeptides besetzten ja die gleiche Bindungsstelle. Die im Vergleich zu den übrigen Paaren schlechte Hemmung des Mutterenzym wurde bereits diskutiert, Ursache könnte die Minikette im aktiven Zentrum sein, die die zur Bindung verfügbare Kontaktfläche deutlich verringert. Ob das stimmt, lässt sich eindeutig

durch die schon diskutierten Hemmversuche mit der Cathepsin H Mutante ohne Minikette klären.

Die lange Form des Cathepsin H Propeptids hemmt zwei der drei anderen Enzyme nach dem gleichen Zwei-Schritt-Mechanismus und mit etwa dem gleichen K_i wie sein Mutterenzym. Bei Cathepsin K ist die Hemmung im ersten Schritt offensichtlich unvollständig, das könnte auch bei den Cathepsinen L und H so sein, ist da aber nicht sicher festzustellen, denn die Hemmwirkung ist da im ersten Schritt viel geringer, so dass im untersuchten Konzentrationsbereich kein eindeutiger Endwert erreicht wird. Die Ausnahme ist Cathepsin S, das um zwei bis drei Größenordnungen schlechter, also etwa bei mikromolaren Konzentrationen gehemmt wird. Hier verläuft die Reaktion so rasch, dass Details zum Reaktionsmechanismus mit der verwendeten Technik nicht mehr zu erfassen sind, es erscheint als klassische Hemmung.

Die kurze Form des Cathepsin H Propeptids zeigt etwa das gleiche Selektivitätsprofil wie die lange Form (Abb. 22A). Auch hier ist die Hemmung von Cathepsin S mit Abstand am schlechtesten; die von Cathepsin L ist bezüglich des K_i mit der des Mutterenzyms vergleichbar, aber sowohl im ersten wie im zweiten Schritt unvollständig. Letzteres gilt auch für Cathepsin K. Die Unvollständigkeit der Hemmung ist verständlich, wenn man sich vorstellt, dass die Substrat-bindende Spalte dieser Enzyme durch das C-terminal verkürzte Propeptid ja nur zum Teil ausgefüllt werden kann und deshalb gute Substrate erfolgreich mit dem Propeptid um die Bindung konkurrieren können. Beim Cathepsin S ist das vermutlich wegen des erheblich größeren K_M für das verwendete Substrat (vergl. Tab 12) nicht zu beobachten. Gestützt wird diese Interpretation durch die Tatsache, dass die lange Form des Propeptids von Cathepsin H im stationären Zustand alle vier Enzyme vollständig hemmt.

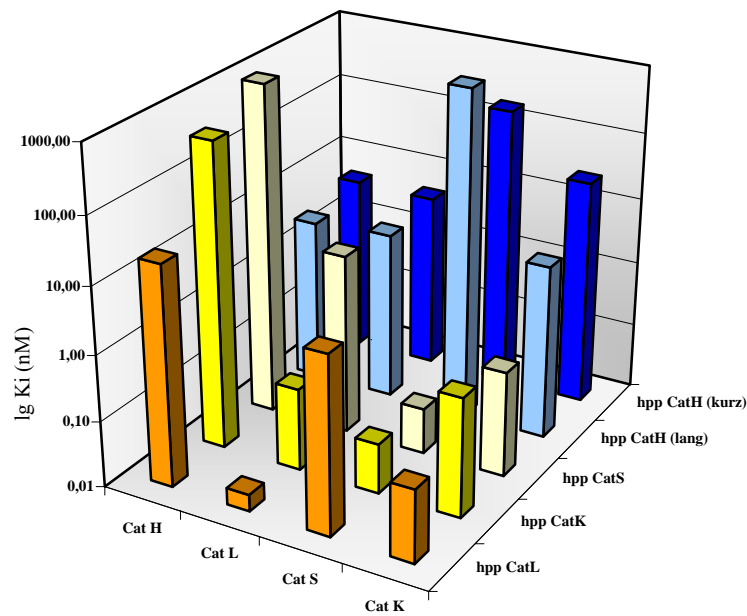
2. Die gute Hemmung von Cathepsin L durch beide hpp CatH-Formen ist nur summarisch, also bezüglich der K_i -Werte mit der des Mutterenzyms vergleichbar, denn zwischen Hin- und Rückreaktionen gibt es jeweils erhebliche Unterschiede (vergl. Abb. 22A und B). Die hpp CatH L-Komplexe sind erheblich labiler als die hpp CatH H-Komplexe, erkennbar am größeren k_{off} . Das wird aber durch eine zwei bis dreifach raschere Bildung ausgeglichen. Das bedeutet, dass hpp CatH seine Konformation im zweiten Schritt der Inhibitionsreaktion besonders rasch, aber nicht perfekt an die der Substrat-bindenden Spalte vom Cathepsin L anpasst.

Auch die umgekehrte Paarung ist eine positive Ausnahme, hpp CatL ist im Vergleich zu hpp CatS und hpp CatK der wesentlich bessere Inhibitor von Cathepsin H. Beide Beobachtungen sind möglicherweise Folge der vergleichsweise engeren Verwandtschaft zwischen den Procathepsinen H und L (vergl. Schema 1).

3. Beim Propeptid vom Cathepsin L, dem Namensgeber der Unterfamilie, habe ich nicht nur die oben schon erwähnte extrem gute Hemmung seines Mutterenzym gefunden, sondern auch die höchste Selektivität. Hier könnte man von einer Co-Evolution zwischen Propeptid und Enzym sprechen.
4. Das Propeptid von Cathepsin S hemmt sein Mutterenzym auch sehr gut, die Selektivität ist aber nicht so ausgeprägt wie beim hpp CatL.
5. Das Propeptid von Cathepsin K ist eine ungewöhnliche Ausnahme, es inhibiert sein Mutterenzym schlechter als die verwandten Cathepsine L und S. Es hemmt das sehr nahe verwandte Cathepsin S etwa mit gleichem K_i und k_{off} wie dessen eigenes Propeptid, d.h. hier handelt es sich tatsächlich um den gleichen Hemmmechanismus und man kann vermuten, dass sich im Verlauf der Procathepsin K Evolution die Enzym-Region stärker verändert hat als die Pro-region. Letztere könnte die Eigenschaften eines gemeinsamen Vorläufers behalten haben, passt inzwischen aber nicht mehr 100%ig zum Mutterenzym. Funktionelle Nachteile sind mit einem Anstieg des K_i um etwa eine Größenordnung (von rund 10^{-10} auf 10^{-9} M) aber offensichtlich nicht verbunden.

Abschließend bietet sich ein Vergleich der eigenen Daten mit den schon erwähnten Ergebnissen von Guay und Mitarbeitern an, die in Abbildung 23 zusammengestellt sind. Auch hier ist hpp CatL der beste und selektivste Inhibitor. Die von mir eindeutig belegte ungewöhnliche Selektivität von hpp CatK ist hier allenfalls zu vermuten, denn hpp CatK und hpp CatS hemmen beide Cathepsin L besser als ihre jeweiligen Mutterenzyme. Beim hpp CatS muss aber berücksichtigt werden, dass der pH von 5,5 keine optimale Inhibition des Mutterenzym zuließ. Die Hemmung von Papain und Cathepsin B durch hpp CatL, hpp CatS und hpp CatK habe ich selbst nicht nochmals untersucht, da alle bisherigen Publikationen die fehlende Hemmwirkung der Propeptide aus der Cathepsin L-ähnlichen Unterfamilie gegenüber den Mitgliedern einer anderer Unterfamilie und bei großen Speziesunterschieden belegen.

A



B

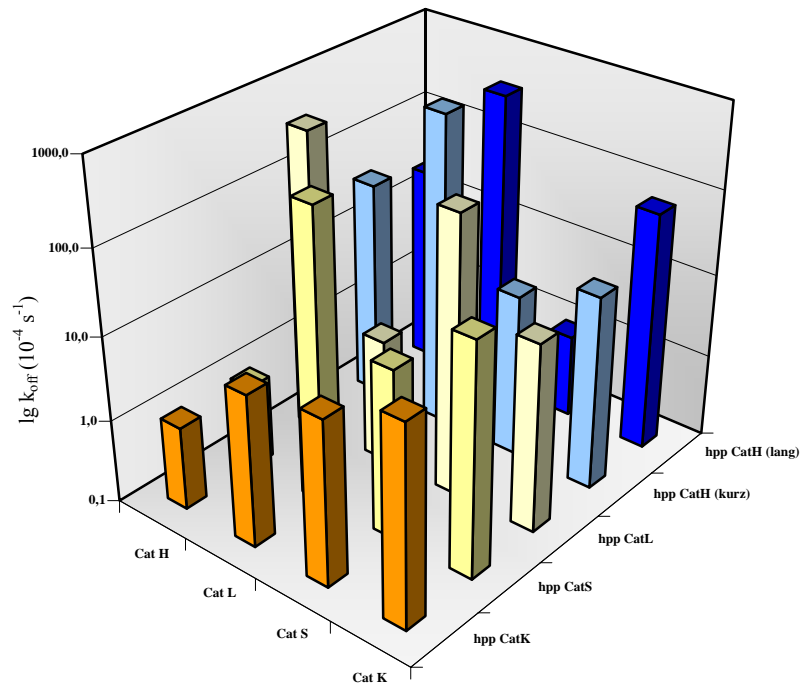


Abb. 22: Darstellung der (A) K_i - und (B) k_{off} - Werte für die Inhibition der reifen Enzyme Cathepsin H, K, L und S durch die rekombinanten Propeptide hpp CatK, hpp CatS, hpp CatL, hpp CatH (kurz) und hpp CatH (lang)

Die Versuche zu den einzelnen Inhibitionskinetiken erfolgten unter Standardbedingungen. Ergänzend zu den Untersuchungen dieser Arbeit ist in diesem Diagramm das inhibitorische Verhalten von hpp CatK und hpp CatS mit den vier Cathepsinen dargestellt.

Die inzwischen verfügbaren Daten zur Selektivität der Hemmwirkung der Propeptide in der Papainfamilie, zu deren Komplettierung ich beigetragen habe, sind eine wichtige Voraussetzung, um in der Grundlagenforschung den Zusammenhang zwischen den

geringfügigen Strukturunterschieden der Zymogene der Papainfamilie und den zum Teil erheblichen Funktionsunterschieden einzelner Molekülbereiche erkennen und verstehen zu können. Das ist Teil der Grundlagenforschung als Voraussetzung für die Computergestützte Entwicklung von selektiven Inhibitoren für einzelne Vertreter dieser medizinisch bedeutsamen Proteasefamilie (Chowdhury et al., 2002).

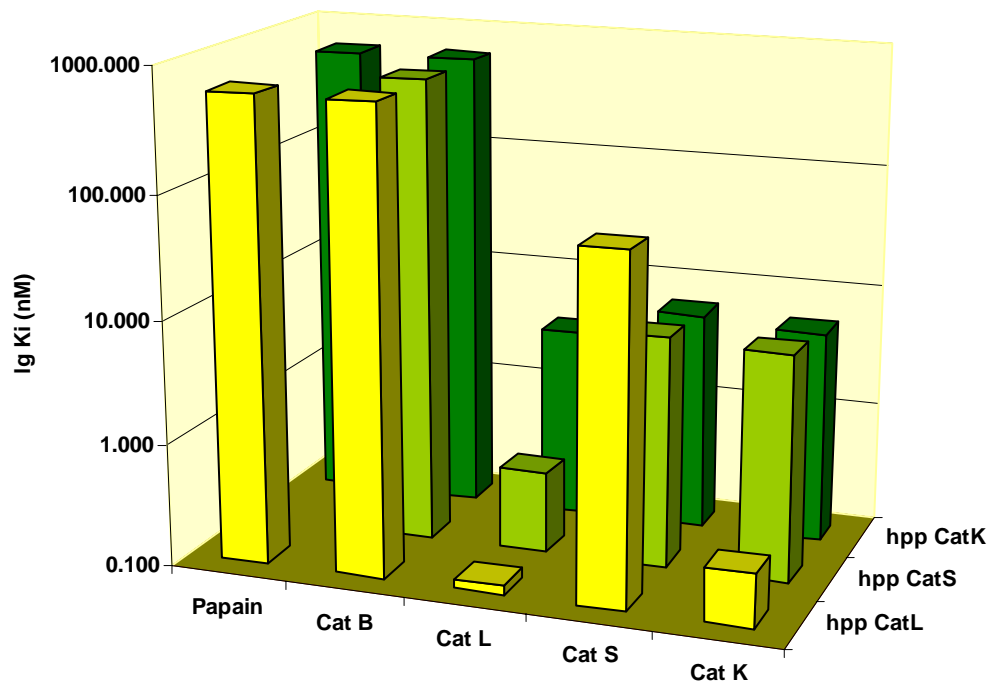


Abb. 23: Darstellung der K_i -Werte für die Inhibition der reifen Enzyme Cathepsin H, K, L, S und Papain durch hpp CatK, hpp CatS und hpp CatL (Guay et al., 2000). Die obengenannten Enzyme wurden mit allen hier aufgeführten Propeptiden getestet. Für die Inhibitionsreaktion von Papain durch das Propeptid von Cathepsin S standen keine K_i -Werte zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

Barrett, A. J., Rawlings, et al., 2001. "Evolutionary lines of cysteine peptidases." Biol Chem **382**(5): 727-733

Baudys, M., Meloun, B., Gan-Erdene, T., Fusek, M., Mares, M., Kostka, V., Pohl, J., Blake, C. C., 1991. „S-S bridges of cathepsin B and H from bovine spleen: a basis for cathepsin B model building and possible functional implications for discrimination between exo- and endopeptidase activities among cathepsins B, H and L." Biomed Biochim Acta. **50**(4-6): 569-577

Billington, C. J., Mason P., Magny M.-C., Mort J. S., 2000. "The Slow-Binding Inhibition of Cathepsin K by Its Proptide". Biochem Biophys Res Commun. **276**: 924-929.

Bohley, P. und Seglen, P. O., 1992. "Proteases and proteolysis in the lysosome." Experientia **48**(2):151-157

Brömme,D., Nallaseth F. S., 2004. "Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases." Methods (Duluth). **32**(2): 199-206.

Carmona, E., Dufour E., et al., 1996. "Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases." Biochemistry **35**(25): 8149-57.

Chowdhury, S. F., Sivaraman, J., Wang, J., Devanathan, G., Lachance, P., Qi, H., Ménard, R., Purisima, E., 2002. "Design of noncovalent inhibitors of human cathepsin L. From the 96-residue proregion to optimized tripeptides." J Med Chem **45**(24): 5321-9

Coulombe, R., Grochulski P., Sivaraman J., Ménard R., Mort J. S., Cygler M., 1996. "Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment." The EMBO Journal **15**(20): 5492-5503.

Coulombe R., Li Y., 1996. "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human procathepsin L." Proteins **25**(3): 398-400.

Cunningham, E. L., Jaswal S. S., et al., 1999. "Kinetic stability as a mechanism for protease longevity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11008-11014.

Cygler, M. and J. S. Mort, 1997. "Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity." Biochimie **79**(11): 645-52.

Cygler M., Sivaraman J., Grochulski P., Coulombe R., Storer A. C., Mort J. S., 1996. "Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cystein protease activity by the proregion". Structure. **4**: 405-416

Dodt J. and Reichwein J., 2003. "Human Cathepsin H: Deletion of the Mini-Chain Switches Substrate Specifity from Aminopeptidase to Endopeptidase". Biol. Chem. **384**: 1327-1332

Dolinar M., Mehle A., Francky B. M., Schweiger A., Turk V., 2000. "Endoproteolytic Pattern Observed During Refolding of a Human Exopeptidase Proenzyme, Procathepsin H, Produced in *Escherichia coli*". Food technol. biotechnol. **38**(1): 5-9

Fox T., de Miguel E., Mort J. S., Storer A. C., 1992. "Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide". Biochemistry. **31**: 12571-6.

Fujishima A., Imai Y., Nomura T., Fujisawa Y., Yamamoto Y., Sugawara T., 1997. "The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64". FEBS Letters. **407**(1): 47-50

Guay, J., Falguyret J., Ducret A., Percival M. D., Mancini A., 2000. "Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides." Eur J Biochem. **267**: 6311-6318

Gunčar G., Podobnik M., Pungercar J., Štrukelj B., Turk V., Turk D., 1998. "Crystal structure of porcine cathepsine H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function". Structure. **6**: 51-61

Guo Y. L., Kurz U., Schultz J. E., Lim C. C., Wiederanders B., Schilling K., 2000. "The α 1/2 helical backbone of the prodomains defines the intrinsic inhibitory specificity in the cathepsin L-like cysteine protease subfamily". FEBS Letters. **469**: 203-207

Kaulmann, G., 2002. "The crystal structure of human procathepsin S wild type." [Dissertation]. Jena, Friedrich- Schiller- Universität.

Kaulmann G., Palm G. J., Schilling K., Hilgenfeld R., Wiederanders B., . "The crystal structure of a Cys25 Ala mutant of human procathepsin S elucidates enzyme-prosequence interactions at the molecular level". Manuskript in Vorbereitung

Koga H., Mori N., Yamada H., Nishimura Y., Tokuda K., Kato K., Imoto T., 1992."Endo- and Aminopeptidase Activities of Rat Cathepsin H". Chem. Pharm. **40**(4): 965-970

Koshland, D. E., 1976. "Role of flexibility in the specificity, control and evolution of enzymes." FEBS Letters E47-E52

Kirschke H., Barrett A. J., 1995. "Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. [Review] [1237 refs]." Protein Prof. **2**(14): 1581-643.

Kreusch S., Fehn M., Maubach G., Nissler K., Rommerskirch W., Schilling K., Weber E., Wenz I., Wiederanders B., 2000. "An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases." Eur J Biochem **267**(10): 2965-72.

Lämmli, U., 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685

LaLonde J. M., Zhao B., Janson C. A., D'Alessio K. J., McQueney M. S., Orsini M. J., Debouck C., Smith W. W., 1999. "The Crystal Structure of Human Procathepsin K". Biochemistry. **38**: 862-869

Lecaille F., Kaleta J., 2002. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. [Review] [375 refs]." Chem Rev. **102**(12): 4459-88.

Linnevers C. J., McGrath M. E., 1997. "Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex." Protein Science. **6**(4): 919-21.

Maubach G., Schilling K., et al. (1997). "The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action." Eur J Biochem **250**(3): 745-50.

McGrath M. E., Sprengeler P. A., et al. (2003). "Peptide ketobenzoxazole inhibitors bound to cathepsin K." Biochemistry. **42**(51): 15018-28.

Mort J. S., Buttle D. J., 1997. "Molecules in Focus - Cathepsin B". Int. J. Biochem. Cell. Biol. **29**: 715-720

Musil D., Zucic D., Turk D., Engh R. A., Mayr I., Huber R., Popovic T., Turk V., Towatari T., Katunuma N., Bode W., 1991. "The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B and the structure basis for its specificity". EMBO J. **10**: 2321-2330

Nishimura, Y. und Kato, K., 1987. "Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin H." Biochem Biophys res Commun. **148**(1): 329-334

Nishimura Y., Kawabata T., et al. 1988. "Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro." Arch Biochem Biophys **261**(1): 64-71.

Nishimura Y., Kawabata T., 1989. "Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes." Arch Biochem Biophys **271**(2): 400-6.

Nishimura Y., Tsuji H., Kato K., Amano J., Himeno M., 1995. "Biochemical Properties and Intracellular Processing of Lysosomal Cathepsin B and H". Biolog. Pharm. Bull. **18**(6): 829-836

Nishimura Y. and Kato K., 1988. "Identification of Latent Procathepsin H in Microsomal Lumen: Characterization of Proteolytic Processing and Enzyme Activation". Archives of Biochemistry and Biophysics. **260**(2): 712-718

Pietschmann S., 2002. Die Foldasefunktion des Propeptids des humanen Cathepsin S [Dissertation]. Jena, Friedrich- Schiller- Universität.

Pietschmann S., Fehn M., 2002. "Foldase function of the cathepsin S proregion is strictly based upon its domain structure." Biol Chem. **383**(9): 1453-8.

Ritonja, A., Popovic, T., Kotnik, M., Machleidt, w., Turk, V., 1988. "Amino acid sequences of the human kidney cathepsins H and L." FEBS Letters **228**(2): 341-345

Schlabrakowski A., 2003. Spezifität der Inhibition von Cathepsin L- ähnlichen Cysteinproteasen mit ihren Propeptiden [Dissertation]. Jena, Friedrich- Schiller- Universität.

Silverman R., 2002. Enzyme Kinetics- Substrate Inhibition. The Organic Chemistry of Enzyme- Catalyzed Reactions. San Diego, Academic Press.

Takahashi, T., Dehdarani, A. H., Tang, J., 1988. "Porcine spleen cathepsin H hydrolyzes solely aminopeptidase activity." J Biol Chem **263**(22): 10952-7

Taylor M. A. J., Baker K. C., Briggs G. S., Connerton I. F., Cummings N. J., Pratt K. A., Revell D. F., Freedman R. B., Goodenough P. W., 1995. " Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes" Protein Engineering. **8**(1): 59-62

- Tchoupé J. R., Moreau T., Gauthier F., Bieth J. G., 1991. "Photometric or fluorometric assay of cathepsin B, L and H and papain using substrates with an aminotrifluoromethylcoumarin leaving group". Biochim Biophys Acta. **1076**: 149-151
- Turk, B., Bieth J. G., Bjork, I., Dolenc, I., Turk D., Cimerman, N., Kos, J., Colic, A., Stoka, V., Turk V., 1995. " Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins." Biol Chem Hoppe Seyler. **376**(4): 225-30
- Turk, B., Dolenc I., Turk V., Bieth J.G., 1993. "Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L." Biochemistry **32**(1): 375-80
- Turk, B., Dolenc, I., Zerovnik, E., Turk D., Gubensek, F., Turk V., 1994. "Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site." Biochemistry **33**(49): 14800-6.
- Turk, B., Turk, V., Turk, D., 1997. "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors." Biol Chem **378**(3-4): 141-150
- Vasiljeva O., Dolinar M., Turk V., Turk B., 2003. "Recombinant Human Cathepsin H Lacking the Mini Chain is an Endopeptidase". Biochemistry. **42**: 13522-13528
- Waghray A., Keppler D., Sloane B. F., Schuger L., Chen Y. Q., 2002. "Analysis of a Truncated Form of Cathepsin H in Human Prostate Tumor Cells". The Journal of Biological Chemistry. **277**(13): 11533-11538
- Wang B., Shi G. P., 1998. "Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization." J Biol Chem. **273**(48): 32000-8.
- Wex, T., Levy B., et al., 1999. "Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins." Biochem Biophys Res Commun **259**(2): 401-7.

Wiederanders B. and H. Kirschke, 1989. "The processing of a cathepsin L precursor in vitro." Arch Biochem Biophys **272**(2): 516-21.

Wiederanders B., Kaulmann G., Schilling K., 2003. "Functions of Propeptide Parts in Cysteine Proteases". Current Protein and Peptide Science. **4**: 309-326

Ich bedanke mich bei allen recht herzlich, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. B. Wiederanders danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Anregungen zur Arbeit und seinen wissenschaftlichen Rat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Schilling für die exzellente Zusammenarbeit und Betreuung während meiner gesamten Doktorantentätigkeit, für die Hilfe beim Lösen von schwierigen Sachverhalten, bei der Durchführung von Experimenten und bei der Interpretation von Ergebnissen.

Des Weiteren möchte ich Frau Anett Kreusch danken, die mir bei den Expressionen und anderen Experimenten helfend zur Seite stand und immer wieder aufmunternde Worte fand. Ohne sie wäre ich sicherlich mehr als einmal darüber verzweifelt.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Cumme danken, der mir beim Berechnen schwieriger Formeln außerordentlich weiterhalf.

Vielen Dank an Frau Dr. Bublitz und Frau Endmann, welche mich sehr nett beim Massenspektrometer unterstützten und natürlich auch an Herrn Dr. Kreusch, der meine Probleme bei verschiedenen computertechnischen Belangen immer zu lösen vermochte.

Last but not least möchte ich mich bei Herrn Lars Rudel bedanken, der mir u. a. bei technischen oder aber auch anderen Sachverhalten viel geholfen und mich auch mental hervorragend unterstützt hat.

Hiermit erkläre ich, Yvonne Benedix, geboren am 05. Februar 1979 in Karl-Marx-Stadt, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quelle in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. K. Schilling, Annett Kreusch und Prof. B. Wiederanders,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Name:	Benedix
Vorname:	Yvonne
geb. am:	05. Februar 1979
in :	Karl-Marx-Stadt
wohnhaft in :	Robert-Koch-Straße 50, 99096 Erfurt
Familienstand:	ledig
September 1985 – Juli 1992	Besuch der Otto-Buchwitz Oberschule in Jahnsdorf/ Erzgeb.
September 1992 – Juli 1997	Erlangung des Abiturs im Carl von Bach Gymnasium in Stollberg/ Erzgeb.
August 1997 – August 1999	1. und 2. Ausbildungsjahr zur Zahnarzthelferin bei Kieferorthopädin MU Dr. Birgit John
September 1999 – Juni 2000	Absolvierung des 3. Ausbildungsjahres und erfolgreicher Abschluss der Ausbildung in der oralchirurgischen Praxis von Herrn Dr. Dr. Andreas Pohl
Juni 2000 – Oktober 2000	berufstätig bei Dr. Dr. Andreas Pohl
Oktober 2000	Beginn des Zahnmedizin-Studiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Februar 2005 – März 2005	Famulatur in Recife/ Brasilien
Juli 2005 – Dezember 2005	Staatsexamen zur Erlangung der zahnärztlichen Approbation
Januar 2006 – April 2006	Fertigstellung der Dissertationsschrift
seit Mai 2006	als Zahnärztin bei Dipl. Stom. Gabriele Albrecht tätig

